



HAL
open science

Apports du séquençage multiloci à la phylogénie et à la taxonomie de deux genres majeurs de bactéries phytopathogènes : *Pseudomonas* et *Xanthomonas*

Marion Fischer-Le Saux, Olivier Pruvost, Emilie Fargier, Nathalie Ah-You, Sophie Bonneau, Carolina Gonzalez, Lionel Gagnevin, Valérie Verdier, Charles Manceau

► To cite this version:

Marion Fischer-Le Saux, Olivier Pruvost, Emilie Fargier, Nathalie Ah-You, Sophie Bonneau, et al.. Apports du séquençage multiloci à la phylogénie et à la taxonomie de deux genres majeurs de bactéries phytopathogènes : *Pseudomonas* et *Xanthomonas*. Actes du BRG, 2008, 7, pp.171-185. hal-04235778

HAL Id: hal-04235778

<https://hal.inrae.fr/hal-04235778v1>

Submitted on 10 Oct 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Copyright

Apports du séquençage multiloci à la phylogénie et à la taxonomie de deux genres majeurs de bactéries phytopathogènes : *Pseudomonas* et *Xanthomonas*

Marion FISCHER-LE SAUX^{(1)*}, Olivier PRUVOST⁽²⁾, Emilie FARGIER⁽¹⁾,
Nathalie AH-YOU⁽²⁾, Sophie BONNEAU⁽¹⁾, Carolina GONZALEZ⁽³⁾,
Lionel GAGNEVIN⁽²⁾, Valérie VERDIER⁽³⁾, Charles MANCEAU⁽¹⁾

⁽¹⁾INRA, UMR A77 Pathologie végétale, 42 rue Georges Morel BP60057,
49071 Beaucozé cedex, France

⁽²⁾CIRAD, UMR C53 Peuplements Végétaux et Bio agresseurs en Milieu Tropical,
7, chemin de l'Irat Ligne Paradis, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France

⁽³⁾IRD, UMR 5096 Laboratoire des Génomes et développement des plantes,
911, avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

Abstract : Contribution of Multilocus sequence analysis to the phylogeny and taxonomy of two major groups of plant pathogenic bacteria : *Xanthomonas* and *Pseudomonas*. The genus *Xanthomonas* and pseudomonads of the “*syringae*” group encompass most of the plant pathogenic bacteria, among which several quarantine organisms registered by the European Council Directive 2000/29/CE and bioterror agents registered in dual-use goods regulations. However the taxonomy of these groups is still controversial or even out-of-date in the case of “*syringae*” group, which makes difficult the drafting and the revision of the statutory texts.

Sequencing of protein-coding genes is more and more used to resolve phylogenetic relationships between highly related species, and within species. Multilocus sequence analysis (MLSA) is a potential alternative to DNA-DNA hybridizations to define bacterial species provided that a sufficient degree of congruence between both methods could be demonstrated.

In this study, we sequenced fragments of four housekeeping genes (*atpD*, *dnaK*, *efp* et *gyrB*) for a collection representative of *Xanthomonas* genus and *gyrB* and *rpoD* genes for more than one hundred strains representative of the nine genomospecies of the “*syringae*” group. Within these two taxa, species and genomospecies are supported by extensive DNA-DNA similarity values which allowed comparison of the methods. Our results showed that MLSA is as resolute as DNA-DNA hybridizations to circumscribe species or genomospecies, and phylogenetic trees are in agreement with previous DNA fingerprints results. Within “*syringae*” group, each genomospecies is represented by a discrete cluster supported by bootstrap values above 98%.

* Correspondance et tirés à part : marion.le-saux@angers.inra.fr

The only incongruence is represented by genomospecies 3 and 8 which form a unique cluster in MLSA. Additional hybridization experiments are needed to solve this point. Partial sequencing of only one gene is sufficient to assign unknown isolates to a genomospecies but insufficient to resolve the phylogenetic relationships between the genomospecies. Within *Xanthomonas*, MLSA data evidenced the distance of *X. albilineans*, *X. hyacinthi* and *X. translucens* from the core genus, and the relationships between previously and newly described species. In both genera, MLSA resolves phylogenetic relationships between highly related species more accurately than *rrs* trees. These data will strongly support the taxonomic studies that are needed in these two major groups of plant pathogenic bacteria.

Pseudomonas/ Xanthomonas/ phylogeny/ taxonomy/ housekeeping gene

Résumé : Le genre *Xanthomonas* et les *Pseudomonas* du groupe «*syringae*» représentent deux groupes majeurs de bactéries phytopathogènes, pour autant leur taxonomie est encore controversée, voire obsolète dans le cas du groupe «*syringae*». Le séquençage de plusieurs gènes de ménage (ou MLSA pour Multilocus Sequence Analysis) est une approche dont l'apport à la systématique des bactéries est indéniable. Elle permet de définir avec plus de précision les relations phylogénétiques entre espèces proches, pour lesquelles le gène *rrs* avait montré ses limites. Dans le cadre de ce projet nous avons séquencé les gènes *atpD*, *dnaK*, *efp* et *gyrB* pour une collection représentative du genre *Xanthomonas* et les gènes *gyrB* et *rpoD* pour une centaine de *Pseudomonas* du groupe «*syringae*». Pour les deux genres, nos résultats montrent que la MLSA possède un seuil de résolution équivalent à celui des hybridations ADN-ADN, technique de référence pour la délimitation de l'espèce bactérienne. Les données obtenues sont cohérentes avec celles de cette technique et celles des empreintes génétiques. La MLSA a permis d'élucider les relations phylogénétiques qui lient les espèces et fournit des données essentielles pour les remaniements taxonomiques envisagés pour ces deux groupes.

Pseudomonas/ Xanthomonas/ phylogénie/ systématique moléculaire/ gène domestique

1. INTRODUCTION

La systématique bactérienne connaît un tournant majeur en raison de l'accès généralisé au séquençage ; la phylogénie moléculaire n'utilise plus exclusivement les gènes de l'opéron ribosomique et le concept d'espèce bactérienne est ardemment discuté, à la lumière des apports de la génétique des populations. Le séquençage de gènes de ménage (Multilocus Sequence Analysis, MLSA) est envisagé comme une alternative aux hybridations ADN-ADN (méthode lourde et maîtrisée par peu de laboratoires) pour la description de nouvelles espèces [12]. Pour valider ce transfert, le comité *Ad Hoc* pour la réévaluation de la définition d'espèce en bactériologie encourage l'étude de collections de souches pour lesquelles de nombreuses données d'hybridation

ADN-ADN sont disponibles [22]. La plupart des bactéries phytopathogènes appartiennent à des complexes d'espèces dont la classification et la nomenclature demeurent encore confuses en raison des divergences entre les classifications phénotypiques et génotypiques. Cette particularité en fait d'excellents modèles pour l'étude du concept d'espèce et le développement de nouvelles approches de systématique.

Les bactéries phytopathogènes sont regroupées dans un nombre assez restreint de genres. Cette homogénéité taxonomique cache une diversité très grande qui s'exprime au niveau pathologique. L'exemple des *Pseudomonas* du « groupe *P. syringae* » et des *Xanthomonas*, divisés en des dizaines de pathovars définis par l'hôte et le type de maladie causée, est caractéristique. Ainsi, plus de 400 hôtes végétaux différents sont attaqués par ces bactéries, dont plusieurs espèces de grand intérêt économique (riz, canne à sucre, banane, *Citrus*...) et l'on assiste de façon récurrente à l'émergence de populations pathogènes responsables d'épidémies dont l'incidence socio-économique peut-être majeure. En Europe, ces observations ont conduit à l'inscription de plusieurs de ces organismes dans les annexes de la directive européenne 2000/29/CE (*P. syringae* pv. *persicae*, *X. arboricola* pv. *pruni*, *X. axonopodis* pv. *phaseoli*...) et dans la réglementation des biens à double-usage (civil et militaire) : *X. albilineans*, *Xanthomonas* pathogènes des *Citrus* et *X. oryzae* pv. *oryzae*.

La taxonomie du genre *Xanthomonas* a été révisée par Vauterin *et al.* [24], qui a décrit 20 espèces sur la base de données d'hybridations ADN-ADN. Depuis de nouvelles espèces ont été décrites dont certaines remettent en cause la classification établie par Vauterin *et al.* [24] entraînant des confusions [14], [8], [20], [21], [9]. Les *Pseudomonas* du « groupe *P. syringae* » constituent une lignée monophylétique au sein du genre *Pseudomonas* [16], [4] qui regroupe dix espèces et plus de 50 pathovars. Les travaux de Gardan *et al.* [11], basés sur l'hybridation ADN-ADN ont montré qu'au moins neuf genomospécies pouvaient être distinguées chez les pathovars de *P. syringae* et les espèces apparentées, mettant ainsi en évidence des espèces synonymes et des espèces cryptiques. En raison de l'absence de caractères phénotypiques discriminants, seules deux genomospécies ont pu être élevées au rang d'espèce.

Ainsi, un écueil majeur, pour la caractérisation de ces bactéries émergentes en vue de l'établissement et de la révision des textes réglementaires, est une systématique encore à ce jour controversée (cas des *Xanthomonas*) ou non révisée (cas des *Pseudomonas*), et on constate l'absence d'outils simples d'identification tant au niveau de l'espèce que du pathovar. Les techniques actuellement utilisées (AFLP et rep-PCR) pour caractériser les pathovars [19], [18] génèrent des données difficilement reproductibles, et ne permettent pas la constitution de bases de données ouvertes à la communauté scientifique.

Le projet a pour objectif de caractériser des collections représentatives du genre *Xanthomonas* et du « groupe *P. syringae* » par séquençage de plusieurs

gènes de ménage, et de comparer les structures phylogénétiques obtenues aux données génomiques (AFLP et hybridations ADN-ADN).

Il s'appuie sur une ressource majeure dans le domaine, la Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP), entretenue par l'UMR A77 (INRA, Beaucozéz, France).

2. MATÉRIEL ET METHODES

2.1. Collections étudiées

La très grande majorité des souches utilisées dans cette étude proviennent de la CFBP. Pour le « groupe *P. syringae* » nous avons caractérisé l'ensemble des souches des travaux de Gardan *et al.* [11] auquel nous avons ajouté des représentants des pathovars décrits depuis cette date, ainsi que les souches type de *P. congelans* et *P. caricapapayae*. La collection de souches de *Xanthomonas* représente la diversité spécifique du genre. Une emphase particulière a été donnée à l'espèce *X. axonopodis*, la plus diverse du genre. Les souches ont été cultivées sur milieu LPGA (Levure 7g/L, Peptone 7 g/L, Glucose 7g/L, agar, 15 g/L) à 27 °C.

2.2. Amplification PCR et séquençage des gènes de ménage

Pour les souches du genre *Pseudomonas*, l'amplification PCR a été réalisée à partir de suspensions bactériennes bouillies. Une portion d'environ 900 pb des gènes *gyrB* (codant pour la sous-unité B de l'ADN gyrase) et *rpoD* (codant pour l'ARN polymérase facteur sigma-70) a été amplifiée selon le protocole décrit par Yamamoto *et al.* [26].

L'ADN des souches de *Xanthomonas* a été extrait suivant le protocole décrit par Llop *et al.* [15]. Les séquences partielles (environ 500 pb) des quatre gènes domestiques suivants (répartis sur le chromosome de *X. campestris* pv. *campestris* souche ATCC33913) : *atpD* (codant pour la chaîne beta de l'ATP synthase), *dnaK* (codant pour la protéine chaperonne DnaK), *efP* (codant pour le facteur d'élongation P) et *gyrB* ont été obtenues à l'aide des amorces décrites dans le **tableau** I.

Tableau I : Amorces utilisées pour l'amplification de fragments de genes dans le genre *Xanthomonas*.

| Gène | Amorce PCR | Sequence (5'-3') | Amorce pour le séquençage | Sequence (5'-3') |
|-------------|-------------|----------------------|---------------------------|----------------------|
| <i>atpD</i> | P-X-ATPD-F* | GGGCAAGATCGTTCAGAT | emiATPD1F | TTCAGATCATCGGCGGGT |
| | P-X-ATPD-R* | GCTCTTGGTCGAGGTGAT | emiATPD2R | TTGGTCGAGGTGATGCGCT |
| <i>dnaK</i> | P-X-DNAK-F* | GGTATTGACCTCGGCACCAC | emidnaK1F | ACCAAGGACGGCGAAGTGCT |
| | P-X-DNAK-R* | ACCTTCGGCATACGGGTCT | emidnaK2R | CGATCGACTTCTTGACCAGG |
| <i>efp</i> | P-X-EFP-F* | TCATCACCGAGACCGAATA | emiefp1F | TCACCGAGACCGAATACG |
| | P-X-EFP-R* | TCCTGGTTGACGAACAGC | P-X-EFP-R* | TCCTGGTTGACGAACAGC |
| <i>gyrB</i> | emigyrB1F | TGCGCGGCAAGATCCTCAAC | emigyrB2F | CGTACCACCGCATCATCT |
| | emigyrB4R | GCGTTGTCTCGATGAAGTC | emigyrB3R | AGGTGCTGAAGATCTGGTCC |

Les produits PCR ont été confiés à la plate-forme OUEST-Génopole ou à Macrogen pour purification et séquençage.

2.3. Analyses phylogénétiques

Les alignements ont été réalisés à l'aide du logiciel Multalin [7]. Les données de séquences ont été concaténées et des arbres phylogénétiques ont été réalisés à l'aide de la méthode Neighbor-Joining (en utilisant le paramètre kimura 2) du package PHYLIP [10]. La robustesse de la topologie obtenue a été évaluée par une analyse de ré-échantillonnage (bootstrap, 1000 réplicats).

2.4. Hybridations ADN-ADN

Les ADN génomiques utilisés pour les hybridations ADN-ADN ont été extraits suivant le protocole de Brenner *et al.* [6]. Les hybridations ADN-ADN ont été effectuées par la technique dite nucléase S1 / acide trichloroacétique comme décrit par Gardan *et al.* [11].

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Phylogénie du complexe « *P. syringae* et espèces apparentées »

L'analyse phylogénétique des séquences met en évidence des résultats très comparables avec les deux gènes *gyrB* et *rhoD* : une structuration en groupes discrets, portés par de longues branches, et validés par de fortes valeurs de bootstrap (Fig. 1). Lorsqu'on compare ces résultats aux données d'hybridation ADN-ADN, on constate que la plupart des genomospecies correspondent à ces groupes monophylétiques validés par de très fortes valeurs de bootstrap. C'est le cas des espèces *P. viridiflava* (genomospecies 6, notée G6) et *P. can-*

nabina (G9), et des genomospecies G2, G4 et G7. La genomospecies G1 forme un groupe monophylétique sur l'arbre *rpoD*, mais pas sur l'arbre *gyrB*.

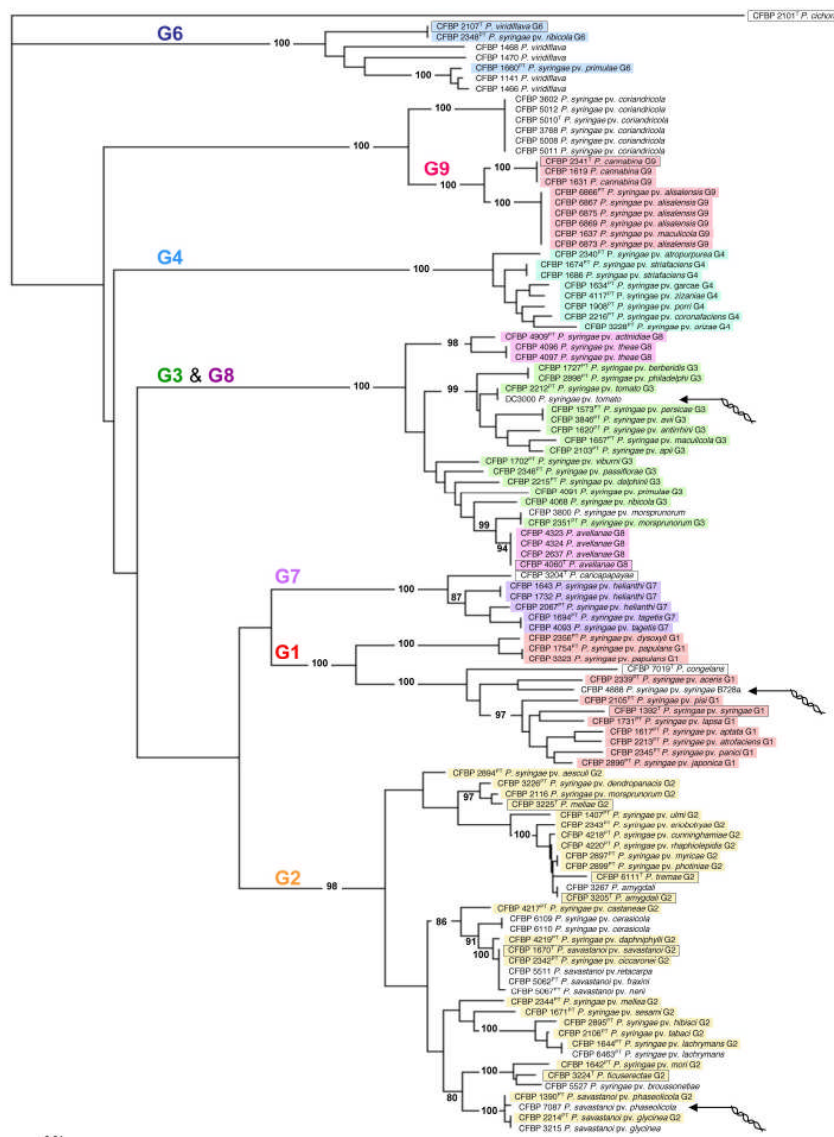


Figure 1 : Arbre phylogénétique des *Pseudomonas* du « groupe *syringae* » construit par Neighbor-Joining d'après les séquences concaténées de fragments des gènes *rpoD* et *gyrB*. Les valeurs de bootstrap significatives ($\geq 80\%$) sont indiquées (1 000 répliqués). Les souches dont l'appartenance à une genomospecies a été déterminée par hybridation ADN-ADN sont surlignées en couleur ; le nom de la genomospecies

est précisé après le nom du taxon (ex. G1). Les souches type sont encadrées. Les souches dont le génome est séquencé sont indiquées par une flèche.

En revanche, sur les deux arbres, les genomospecies G3 et G8 (pv. *theae*, *actinidiae* et *P. avellanae*) sont mélangées dans le même groupe phylogénétique. Le même résultat est obtenu sur le dendrogramme de F-AFLP (données du laboratoire non montrées). Il s'agit du seul cas d'incongruence entre les données MLSA et F-AFLP d'une part, et hybridations ADN-ADN d'autre part. Il est à noter que ces deux genomospecies ne sont distinguées que sur la base de deux valeurs d'hybridations [11]. Une étude d'hybridations ADN-ADN avec de plus nombreuses valeurs croisées entre ces deux genomospecies est en cours pour confirmer ou infirmer l'existence de deux genomospecies distinctes.

Par ailleurs, cette étude a permis de mettre en évidence plusieurs synonymies de noms d'espèce. L'espèce *P. tremae*, définie comme la genomospecies 5 par Gardan *et al.* [11] se place au sein des souches de la genomospecies 2 dans cette étude. Nous avons confirmé ce résultat par hybridations ADN-ADN : *P. tremae* hybride à 71-80 % avec les souches de la genomospecies 2 et 28-52 % avec les souches des autres genomospecies. Ainsi *P. tremae*, *P. meliae*, *P. amygdali*, *P. savastanoi* et *P. ficuserectae* appartiennent à la même genomospecies.

L'espèce *P. congelans*, qui correspond à des souches isolées de la phyllosphère d'herbe, se place clairement parmi les souches de la genomospecies 1 et ne constituerait donc pas une nouvelle espèce. Sur la base d'un arbre phylogénétique du gène de l'ARNr16S, Behrendt *et al.* [5] avaient identifié *P. savastanoi* (genomospecies 2) comme l'espèce la plus proche et n'avaient utilisé que cette espèce pour les hybridations AND-ADN. Des discordances entre les topologies des arbres déduits du gène *rrs* et des gènes de ménage ont déjà été montrées dans le genre *Pseudomonas* [26], [2]. Elles sont dues au faible pouvoir résolutif du gène *rrs* lorsqu'il s'agit d'étudier des espèces ayant divergé très récemment. Cet exemple met en exergue les limites de la phylogénie basée uniquement sur le gène de l'ARNr 16S pour révéler les relations phylogénétiques entre espèces proches et identifier les plus proches voisins phylogénétiques d'un isolat lors des études taxonomiques.

L'espèce *P. caricapapayae* se place avec les souches de la genomospecies 7. Seule souche type d'espèce de ce groupe identifiée à ce jour, elle donnera le cas échéant son nom à cette genomospecies.

Les pathovars décrits depuis 1999, ont pu être classés sans ambiguïté dans une genomospecies. *P. syringae* pv. *fraxini*, *nerii*, *castaneae*, *cunninghamiae*, *daphniphylli*, *raphiolepidis*, *retacarpa*, *broussonetiae*, *cerasicola* appartiennent à la genomospecies 2. Ce résultat a été confirmé par hybridation ADN-ADN pour quatre de ces pathovars. *P. syringae* pv. *alisalensis* et pv. *coriandricola* se regroupent avec *P. cannabina* (genomospecies 9), mais ces trois taxons forment trois

branches distinctes. *P. syringae* pv. *spinaceae*, *avii* et *actinidiae* se placent dans le groupe phylogénétique incluant les souches des genomospecies 3 et 8.

Le génome de trois souches du « groupe *P. syringae* » est actuellement séquencé. Il s'agit de *P. syringae* pv. *syringae* B728a, *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A et *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. Bien qu'elles portent le même nom d'espèce, ces trois souches représentent trois genomospecies différentes (fig. 1). Afin que ce statut d'espèces différentes soit intégré dans les études de génomique comparative, il devient urgent de nommer ces genomospecies.

La MLSA est donc un outil puissant dont le niveau de discrimination est équivalent à celui des hybridations ADN-ADN. Le séquençage d'un seul gène suffit pour attribuer une souche à une genomospecies, mais est insuffisant pour décrire les relations phylogénétiques qui les lient. En perspectives, nous envisageons d'offrir aux phytopathologistes un langage commun en proposant un statut d'espèce aux genomospecies G1, G2, G3/G8, G4, et G7. L'absence de caractères phénotypiques discriminants pour identifier ces espèces sera compensée par un outil rapide d'identification des espèces par comparaison des séquences du gène *gyrB* ou *rpoD* à une base de données de référence disponible sur internet (site de la CFBP).

3.2. Phylogénie du genre *Xanthomonas*

Une représentation schématique de l'arbre phylogénétique du genre *Xanthomonas* obtenu après concaténation des séquences des quatre gènes de ménage *atpD*, *dnaK*, *efp* et *gyrB*, est présentée figure 2. Les différentes espèces décrites par Vauterin *et al.* [25] forment des lignées distinctes soutenues par de fortes valeurs de bootstrap (ex. *X. campestris*, *X. vesicatoria*, *X. arboricola*). Certaines espèces sont regroupées en groupes monophylétiques soutenus par de fortes valeurs de bootstrap. C'est le cas par exemple de *X. hortorum*, *X. populi* et *X. cynarae* (bootstrap de 100 %) et de *X. albilineans*, *X. hyacinthi* et *X. translucens* (100 %) (fig. 2). Ce dernier groupe est phylogénétiquement très éloigné des autres espèces du genre *Xanthomonas*, et l'amplification de certains gènes de souches de ce groupe a posé problème. Le génome d'une souche de *X. albilineans* sera bientôt disponible. Ces données permettront de dessiner de nouvelles amorces plus adaptées à ce groupe d'espèces très divergentes.

Cette structuration génétique des espèces de *Xanthomonas* est en accord avec les résultats de Parkinson *et al.* [17] basé sur la séquence partielle du gène *gyrB*. Cependant, l'arbre construit avec les 4 gènes de ménage souligne de façon beaucoup plus marquée, la divergence des espèces *X. albilineans*, *X. translucens* et *X. hyacinthi* des autres espèces du genre. Cette observation rejoint les résultats de Hauben *et al.* [13] basé sur le gène *rxy*. Ces auteurs soulignent le très haut degré de conservation du gène *rxy* (moyenne des valeurs de similitudes supérieure à 98 % au sein du genre *Xanthomonas*) et un niveau de résolution qui n'atteint pas

celui des hybridations ADN-ADN. Il en résulte que les différentes souches d'une même espèce ne forment pas de groupes monophylétiques. Au contraire, les gènes codant des protéines utilisés dans la présente étude, présentent un niveau de résolution comparable à celui des hybridations ADN-ADN et sont de bons marqueurs de la différenciation des espèces.

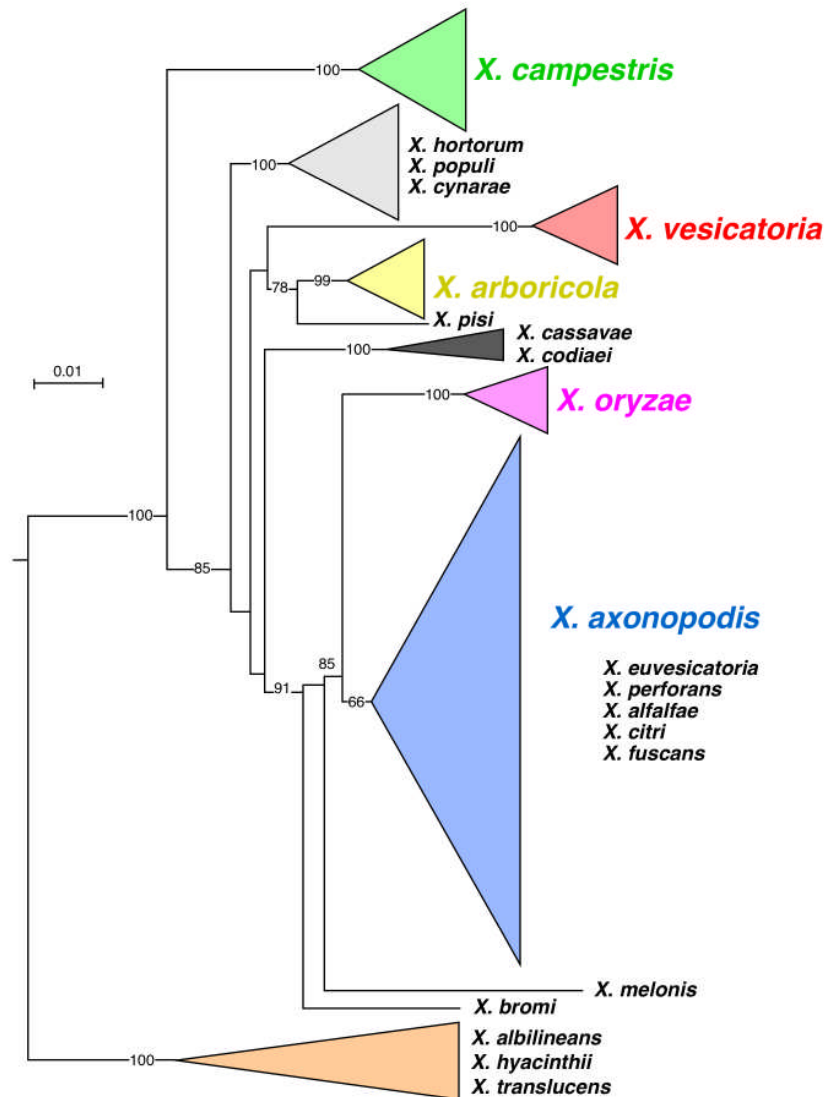


Figure 2 : Arbre phylogénétique du genre *Xanthomonas* construit par Neighbor-Joining à partir des données concaténées de séquences partielles de quatre gènes de

ménage (*atpD*, *dnaK*, *efp* et *gyrB*). Les valeurs de bootstrap (>60) après 1000 simulations sont représentées sur cette figure.

Depuis la révision du genre *Xanthomonas* par Vauterin *et al.* [24], sept nouvelles espèces ont été décrites. La caractérisation de l'agent pathogène émergent responsable de la graisse de l'artichaut a conduit à la description de *X. cynarae* [23]. L'analyse MLSA place cette espèce dans le groupe incluant *X. hortorum* et *X. populi* (Fig. 2). Ce résultat concorde avec les données d'hybridations ADN-ADN, qui montrent que sur les 20 espèces testées, les plus fortes valeurs d'hybridation sont trouvées avec ces deux espèces (49 %).

Les espèces *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. alfalfae*, *X. citri* et *X. fuscans* ont été décrites suite à l'étude d'une collection de souches représentant des pathovars de l'espèce *X. axonopodis* [14], [20], [21]. Ces nouvelles espèces se placent dans l'analyse MLSA au sein du groupe constitué des souches de *X. axonopodis* dans lequel elles forment chacune des groupes monophylétiques présentant de fortes valeurs de bootstrap (Fig. 2 et 3). Les propositions de Jones *et al.* [14] et Schaad *et al.* [20] ne reviennent donc pas à proposer de nouvelles espèces dans un système de classification établi, mais à proposer un nouveau système de classification qui place la limite d'espèce à un seuil inférieur. Ces deux schémas de classification se chevauchant (deux nomenclatures différentes sont possible pour les mêmes souches), ils ne sont pas compatibles et c'est à l'utilisateur de faire le choix d'adopter l'une ou l'autre des nomenclatures. Les données MLSA ne contredisent aucune des deux classifications (les espèces proposées forment toutes des lignées phylogénétiques distinctes).

L'utilisation d'une collection partielle par Schaad *et al.* [20] pose cependant problème. Par exemple, il a été montré récemment par F-AFLP que *X. axonopodis* pv. *phaseoli* est constitué de 4 lignées génétiques [3]. Les représentants d'une seule de ces lignées ont été étudiés par Schaad *et al.* [20] et reclassés dans l'espèce *X. fuscans* subsp. *fuscans*. Nos données MLSA (Fig. 3) montrent que si l'on adoptait la classification proposée par Schaad *et al.* [20] les trois lignées génétiques restantes de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* se placeraient dans des espèces ou sous-espèces différentes qui restent à décrire. Une problématique similaire a été montrée avec les souches du pathovar *mangiferaeindicae* [1].

En conclusion, nos données soulignent l'hétérogénéité génétique de *X. axonopodis* (Approved Lists 1980) emend. Vauterin *et al.* 1995 par rapport aux autres espèces du genre. La structure génétique de cette espèce révélée par MLSA est cohérente avec les résultats antérieurs de rep-PCR et d'AFLP [18], [3], [1] et d'hybridations ADN-ADN [24], [14], [20]. La question fondamentale soulevée par ces données est « où placer le seuil de délimitation de l'espèce ? ». Une étude plus approfondie par une approche polyphasique permettra de clarifier la taxonomie de ce groupe qui inclut plusieurs orga-

nismes d'importance réglementaire du point de vue de la quarantaine ou du bioterrorisme.

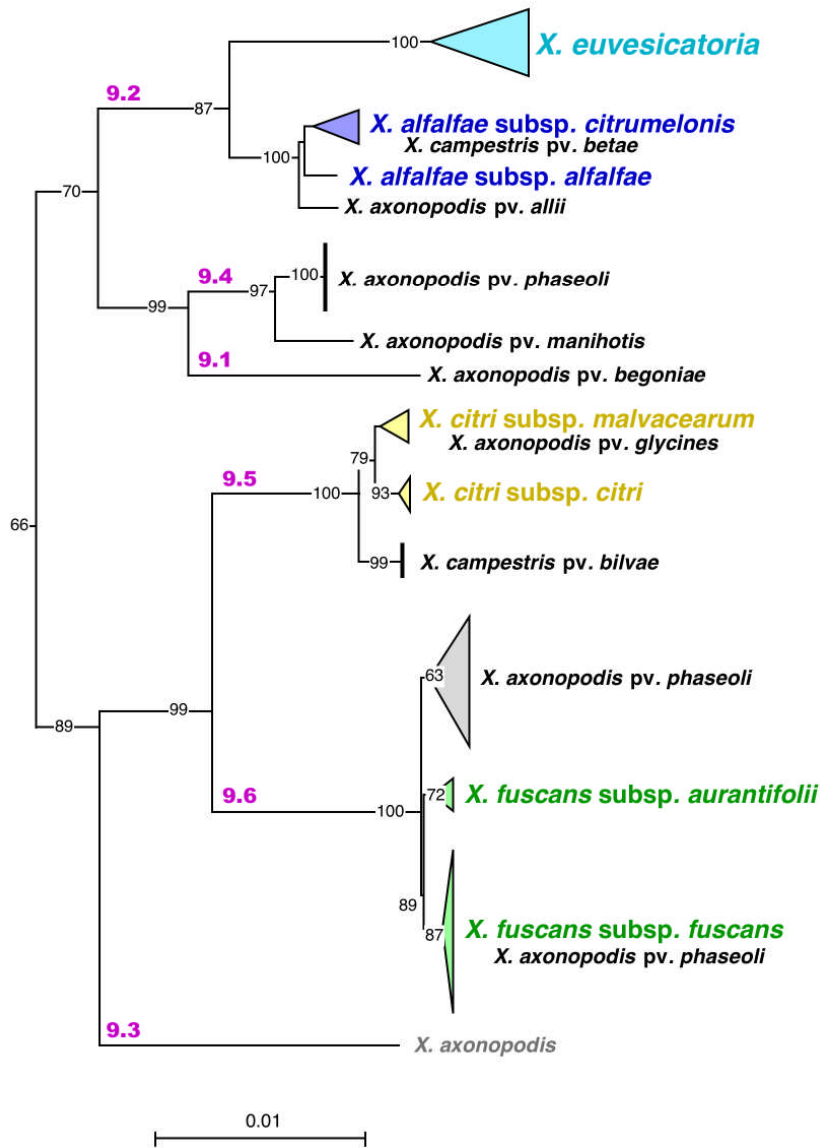


Figure 3 : Portion de l'arbre phylogénétique du genre *Xanthomonas*, correspondant à l'espèce *X. axonopodis* (Approved Lists 1980) emend. Vauterin *et al.* 1995 [24]. Cet arbre a été construit par Neighbor-Joining à partir des données concaténées de séquences partielles de quatre gènes de ménage (*atpD*, *dnaK*, *efP* et *gyrB*). Les valeurs

de bootstrap (>60) après 1000 simulations sont représentées sur cette figure. Les indications 9.1 à 9.6 désignent la correspondance avec les groupes identifiés par Rademaker *et al.* [18] par rep-PCR.

4. CONCLUSION

Nos résultats montrent que pour les deux groupes bactériens majeurs de bactéries phytopathogènes étudiés, la MLSA possède un seuil de résolution équivalent à celui des hybridations ADN-ADN, et fournit des données cohérentes avec cette technique et celles des empreintes génétiques. Cette approche, facile à mettre en œuvre, générant des données facilement échangeables et pouvant être mises à disposition dans des bases de données, représente incontestablement une alternative prometteuse aux hybridations ADN-ADN pour la délimitation des espèces bactériennes. Il reste cependant à définir quels critères utiliser pour délimiter le seuil de l'espèce bactérienne. Au-delà de règles strictes et de seuils, le plus raisonnable serait de conserver une approche polyphasique intégrant la topologie de l'arbre MLSA et un maximum de données génotypiques, phénotypiques et écologiques.

Les séquences des gènes de ménage issues du présent projet viennent enrichir la base de données liée aux accessions de la CFBP. En interne, ces séquences représentent « la carte d'identité génétique » des souches et pourront être utilisées au cours des contrôles qualité visant l'authentification de l'identité du matériel biologique détenu à la CFBP. Ces contrôles répondent aux exigences des lignes directrices de l'OCDE relatives aux pratiques exemplaires concernant les centres de ressources biologiques et aux exigences de la norme AFNOR NF S 96-900 « qualité des centres de ressources biologiques » en cours de préparation. En externe, l'objectif est de créer un service d'identification interactif des *Xanthomonas* et des *Pseudomonas* sur le site web de la CFBP (<http://www.angers.inra.fr/cfbp/>) au travers d'outils dédiés à l'identification moléculaire (BLAST en lien avec des bases de données d'intérêt taxonomique, logiciels d'alignements et de reconstruction phylogénétique).

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été financés par le Bureau des Ressources Génétiques (AP 2005-2006). La majorité du séquençage a été réalisée par la plate-forme

séquençage et génotypage de OUEST-Génopole. Alain Huard est remercié pour son aide dans la mise en forme des figures.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Ah-You N., Gagnevin L., Chiroleu E., Jouen E., Neto J.R., Pruvost O., 2007. - Pathological variations within *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* support its separation into three distinct pathovars that can be distinguished by amplified fragment length polymorphism. *Phytopathology*, 97: 1568-1577.
- [2] Ait Tayeb L., Ageron E., Grimont F., Grimont P.A.D., 2005. - Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. *Research in Microbiology*, 156: 763-773.
- [3] Alavi S.M., Sanjari S., Durand F., Brin C., Manceau C., Poussier S., 2008. - Assessment of the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* as a basis to identify putative pathogenicity genes and a type III secretion system of the SPI-1 family by multiple suppression subtractive hybridizations. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 3295-3301.
- [4] Anzai Y., Kim H., Park J.Y., Wakabayashi H., Oyaizu H., 2000. - Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 1563-1589.
- [5] Behrendt U., Ulrich A., Schumann P., 2003. - Fluorescent pseudomonads associated with the phyllosphere of grasses; *Pseudomonas trivialis* sp. nov., *Pseudomonas poae* sp. nov. and *Pseudomonas congelans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1461-1469.
- [6] Brenner D.J., McWhorter A.C., Knutson J.K., Steigerwalt A.G., 1982. - *Escherichia vulneris*: a new species of Enterobacteriaceae associated with human wounds. *Journal of Clinical Microbiology*, 15: 1133-1140.
- [7] Corpet F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16: 10881-10890
- [8] Euzéby J., 2006. - List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 925-927.
- [9] Euzéby J., 2007. - List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 893-897.
- [10] Felsenstein J., 1989. - PHYLIP - Phylogeny Inference Package (version 3.2). *Cladistics*, 5: 164-166.
- [11] Gardan L., Shafik H., Belouin S., Broch R., Grimont F., Grimont P.A.D. 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremiae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 469-478.
- [12] Gevers D., Cohan F.M., Lawrence J.G., Spratt B.G., Coenye T., Feil E.J., Stackebrandt E., Van de Peer Y., Vandamme P., Thompson F.L., Swings J., 2005. - Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews. Microbiology*, 3: 733-739.

- [13] Hauben L., Vauterin L., Swings J., Moore E.R.B., 1997. - Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 328-335.
- [14] Jones J.B., Lacy G.H., Bouzar H., Stall R.E., Schaad N.W., 2004. - Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 755-762.
- [15] Llop P., Caruso P., Cubero J., Morente C., Lopez M.M., 1999. - A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods* 37: 23-31.
- [16] Moore E.R.B., Mau M., Arnscheidt A., Bottger E.C., Hutson R.A., Collins M.D., Van de Peer Y., De Wachter R., Timmis K.N., 1996. - The determination and comparison of the 16S rRNA gene sequences of species of the genus *Pseudomonas (sensu stricto)* and estimation of the natural intrageneric relationships. *Systematic and Applied Microbiology*, 19: 478-492.
- [17] Parkinson N., Aritua V., Heeney J., Cowie C., Bew J., Stead D., 2007. - Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2881-2887.
- [18] Rademaker J.L.W., Louws F.J., Schultz M.H., Rossbach U., Vauterin L., Swings J., de Bruijn F.J., 2005. - A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 95: 1098-1111.
- [19] Roumagnac P., Gagnevin L., Gardan L., Sutra L., Manceau C., Dickstein E.R., Jones J.B., Rott P., Pruvost O., 2004. - Polyphasic characterization of xanthomonads isolated from onion, garlic and Welsh onion (*Allium* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 15-24.
- [20] Schaad N.W., Postnikova E., Lacy G.H., Sechler A., Agarkova I., Stromberg P.E., Stromberg V.K., Vidaver A.K., 2005. - Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel *et al.*, 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. rev.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker *et al.*, 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 494-518.
- [21] Schaad N.W., Postnikova E., Lacy G., Sechler A., Agarkova I., Stromberg P.E., Stromberg V.K., Vidaver A.K., 2006. - Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 690-695.
- [22] Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A.D., Kampfner P., Maiden M.C.J., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J., Truper H.G., Vauterin L., Ward A.C., Whitman W.B., 2002. - Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 1043-1047.
- [23] Trebaol G., Gardan L., Manceau C., Tanguy J.L., Tirilly Y., Boury S., 2000. - Genomic and phenotypic characterization of *Xanthomonas cynarae* sp. nov., a new

- species that causes bacterial bract spot of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 1471-1478.
- [24] Vauterin L., Hoste B., Kersters K., Swings J., 1995. - Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 472-489.
- [25] Vauterin L., Rademaker J., Swings J., 2000. - Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 90: 677-682.
- [26] Yamamoto S., Kasai H., Arnold D.L., Jackson R.W., Vivian A., Harayama S., 2000. - Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology*, 146: 2385-2394.