



HAL
open science

Caractérisation de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* l'agent responsable de l'émergence d'une épidémie de chancre bactérien du kiwi en France et description de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum*, agent causal de taches foliaires sur kiwi.

Amandine Cunty

► To cite this version:

Amandine Cunty. Caractérisation de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* l'agent responsable de l'émergence d'une épidémie de chancre bactérien du kiwi en France et description de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum*, agent causal de taches foliaires sur kiwi.. Agronomie. Université d'Angers, 2015. Français. NNT : 2015ANGE0018 . tel-01461597

HAL Id: tel-01461597

<https://theses.hal.science/tel-01461597>

Submitted on 20 Feb 2017

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.

Thèse de Doctorat

Amandine CUNTY

Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans

École doctorale : Végétal, Environnement, Nutrition,
Agroalimentaire, Mer (VENAM)

Discipline : 3DOBO

Spécialité : Physiologie, Biologie des organismes, Populations, Interactions

Unité de recherche : EmerSys, UMR1345 IRHS (Université d'Angers

INRA, Agrocampus-Ouest)

Laboratoire de la santé des végétaux d'Angers, Anses

Soutenue le 8 décembre 2015

Thèse N° :

Caractérisation de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* l'agent responsable de l'émergence d'une épidémie de chancre bactérien du kiwi en France et description de *Pseudomonas* *syringae* pv. *actinidifoliorum*, agent causal de taches foliaires sur kiwi.

JURY

Rapporteurs : **Odile BERGE**, Chargée de recherche, INRA
Christian VERNIERE, Chargé de recherche, CIRAD

Examineurs : **Maria Milagros LOPEZ**, Directrice de recherche, IVIA
Philippe SIMONEAU, Professeur, Université d'Angers
Bruno LE CAM, Directeur de recherche, INRA

Directeur de Thèse : **Charles MANCEAU**, Directeur de la santé des végétaux, Anses
Encadrante de thèse : **Sophie CESBRON**, Ingénieur d'étude, INRA

Remerciements

La thèse c'est un peu comme les montagnes russes. Au début on a les yeux qui pétillent à l'idée de vivre une expérience nouvelle, on sait que l'on va avoir des décharges d'adrénaline, que l'on va vers l'inconnu et on ne peut résister. Donc au départ on se dit, même pas peur ! Bref, on s'installe dans le wagon et ça commence tout doucement... RAS, je me sens comme un poisson dans l'eau. Et tout d'un coup première descente... Ahhhhhhhhhhhhhhhhh... mais qu'est-ce que je fais là ???? Puis le wagon remonte une nouvelle pente et on se dit « génial ! Encore ! », et ce durant 3 ans. Une fois fini on se dit que l'on repartirait bien pour un deuxième tour... Tout au long du trajet j'ai été accompagnée par de nombreuses personnes qui ont pris place dans le wagon à côté de moi et qui ont participé de près ou de loin à la réussite de mon projet de thèse.

Je remercie en premier lieu les membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer mes travaux de thèse. Je remercie les rapporteurs Odile Berge et Christian Vernière, ainsi que les examinateurs Maria-Milagros Lopez (qui a bien voulu prolonger son séjour en France), Philippe Simoneau et Bruno Le Cam.

Je remercie Cindy Morris d'avoir bien voulu faire partie de mon CST et pour toutes les discussions scientifiques et moins scientifiques que nous avons pu avoir lors des congrès. Un grand merci aussi à Joël Vanneste. Ce fut un plaisir de travailler avec toi durant ces trois mois précédant la thèse et que tu acceptes de faire partie de mon CST. Nos discussions scientifiques furent, et sont toujours aussi enrichissantes. Tu es pour moi la « radio Psa » internationale ! J'espère que nos chemins scientifiques se croiseront à nouveau (je ne serais pas contre de retourner en Nouvelle-Zélande...).

Je commencerai mes remerciements pour l'INRA pas Sophie Cesbron, mon encadrante de thèse. Mille mercis pour ton aide, ton soutien et ta générosité au cours de ces trois ans. J'ai apprécié travailler à tes côtés, tu étais toujours de bon conseil et très disponible. C'était la première fois que tu encadrais une thèse et ce fut « tip-top ». Ne change rien, surtout pas tes petites blagues glissées au milieu des commentaires pour la correction du manuscrit !!! Et n'oublie pas que les nodules il ne faut pas trop les laisser à l'air libre sinon ils se déshydratent... et ça ce n'est pas tombé dans l'oreille d'un aveugle !!!! Marie-Agnès, je suis ravie d'avoir pu faire cette thèse au sein de ton équipe. Tu as toujours prêté une oreille attentive à mes questions et c'est toujours avec rapidité (digne de Speedy Gonzalès) et rigueur que tu as participé à la correction des papiers, merci beaucoup, cela a été très formateur pour moi. Martial, oh toi « Dieu de la bio-informatique », merci pour ta disponibilité, pour ces scripts que j'assimilais à des hiéroglyphes et que tu as décrypté pour moi. Un grand merci à Sophie B. (championne avérée de badminton) et Karine qui m'ont mise sur les rails techniques et

logistiques des analyses phylogénétiques, à Marion pour ton partage de tes connaissances en phylogénie et taxonomie. Chrystelle, c'était chouette de partager avec toi les repas du midi, remplis de ta bonne humeur (n'oublie pas, le léopard n'est pas un fashion faux-pas). Au sein de la CFBP je remercie Perrine, Géraldine, Audrey et Cécile d'avoir bien voulu mettre en collection les quelques soixantaines de souches de Psa et pour le séquençage des génomes de la liste au Père Noël. Merci à Jacky, Armelle, Anne, Tristan (le roi du foie gras et surtout un excellent orateur scientifique), Matthieu (passe le bonjour à 'Alejandro', et ne change rien à ton humour c'est top), Nicolas C. (promis, je vais essayer les fourmis), Nicolas D. (je te souhaite le meilleur pour ton post-doc, et n'oublie jamais l'hymne des sardines), pour leur bonne humeur, leur gentillesse et les discussions scientifiques et moins scientifiques. Mylène et Samir ce fut un plaisir de vous connaître et je vous souhaite plein de bonnes choses pour votre thèse. Arnaud, quel chouette moment le congrès à Shanghai. Je te souhaite de trouver rapidement un poste qui te convienne et dans lequel tu pourras t'épanouir. Céline, la miss « R », merci beaucoup pour tes coups de pouces (surtout pour la mise en page du manuscrit) et toutes nos discussions. Je suis sûre que tu vas continuer ton bout de chemin sans embuches. Jef, petit rayon de soleil... Tu es une personne formidable, généreuse, toujours à l'écoute et de bon conseil. Je te souhaite le meilleur pour la suite, tu le mérites tellement, que la roue tourne enfin... Miss Déborah, ben voilà après deux ans sympathiques passés à tes côtés je vais te laisser finir la route toute seule. En même temps mieux vaut être seule que mal accompagnée ! (humour bien sûr). Sans moi tu vas pouvoir réduire le nombre de cigarettes!!! Tu as toutes les cartes en main pour faire une fin de thèse du tonnerre, j'en suis persuadée. Et promis je serai là pour le jour « J ».

Pour l'équipe Ecofun, j'adresse un grand merci à Christophe pour le partage de tes connaissances en génétique des populations, ta gentillesse et ta générosité. C'était chouette d'avoir bossé avec toi sur le premier papier. Les repas du midi en ta compagnie feront toujours écho avec de bons fou-rire mémorables ! Et au fait Christophe, « Bonne Année » !!! Mélanie, merci pour ton aide, ta gentillesse et ton soutien, surtout lors de mes dernières manips en juillet. Le repas raclette tombait à point nommé pendant la période de rédaction, c'était super, merci beaucoup. Je te souhaite plein de bonnes choses avec ton bout de chou. Marie, ah que de partages scientifiques autour des chats... j'espère que tu vas vite trouver ton chemin, à l'étranger peut-être ? Gaëlle, je te souhaite le meilleur pour la poursuite de la thèse. Bruno, je te donnerai bientôt les dates de mon prochain talk à Las Vegas « Kiwigirl is back », c'est promis ! Jérôme (promis je ne verrai plus le modèle en zig-zag du même œil), Natalia, Frédérique, Marie-Noëlle, Pascal et Valérie, j'ai beaucoup apprécié votre gentillesse et votre bonne humeur au quotidien en tant que voisines de bureau. Pour l'équipe respom, je remercie Nat pour ses connaissances en stat, Alex, Patton et Matthieu pour leur sympathie et leur bonne humeur.

Passons maintenant au LSV d'Angers. Je tiens en premier lieu à remercier Charles, mon directeur de thèse. Merci Charles pour toutes ces connaissances que tu m'as transmises, ta disponibilité et tes encouragements. Ce n'était pas toujours évident d'avoir mon directeur de thèse dans un autre laboratoire, mais tu as su être présent quand il le fallait. J'espère que nos routes professionnelles se croiseront à nouveau. Un énorme merci à Françoise et Carène qui m'ont fait confiance en décembre 2011 pour reprendre le dossier kiwi au LSV... qui m'a ensuite amené à la thèse. Françoise, merci pour votre écoute, votre disponibilité, votre générosité, votre soutien et votre implication tout au long de la thèse. Le petit crochet à Venise est un très bon souvenir pour moi, un peu au pas de course tout de même ! Carène (Reine de la qualité), merci pour ton aide, ton appui scientifique, ta disponibilité sans faille et ta gentillesse. Ce fut un bonheur de travailler avec toi. Méryl, ma p'tite Méryl (Roumiaou ?), merci pour tes conseils scientifiques et techniques en qPCR, ton écoute, ta joie de vivre et ces bons moments de rigolade. Je poursuis avec l'équipe bactériologie. Valérie, merci à toi aussi pour ta disponibilité, ton soutien et tes encouragements. Quand je repense à Shanghai, je me dis que nous avons passé des moments forts sympathiques (gambé !!!!). Merci aux reines de l'isolement de Psa: Corinne, Sandrine, Christelle F. (merci d'avoir toujours traité rapidement les commandes de sondes et pour ton aide pour Kiwipop) et Carène (hé oui encore un merci pour toi !); à Christelle D., Bruno et Dimitri pour leur gentillesse, leur disponibilité et leurs conseils. Ce fut un réel plaisir pour moi de travailler au sein de l'équipe bactériologie, et je m'y suis sentie tellement bien intégrée que je n'ai pas envie de la quitter... croisons les doigts... Merci à toutes les personnes des autres équipes pour leur accueil, leur aide et leur bonne humeur. Équipe virologie: Anne L., Anne S., Isabelle, Michèle, Marianne, Pascal et Pascaline ; équipe OGM : Anne-Laure, David, Vincent, Méryl ; équipe ERB : Christine, Nathalie, Emmanuel et Xavier ; équipes administration et qualité : Stéphanie (merci pour ton aide pour le casse-tête que représentait la gestion du budget de thèse), Laurence (merci pour ta patience pour les préparations des missions), Luc, Philippe, Sylvie, et Caroline, et enfin les pro de l'informatique Monique et Lénaïc qui ont plus d'une fois volé à mon secours. Au sein de la Direction je tiens à remercier grandement Géraldine et Nathalie. Merci pour votre accueil au sein du LSV d'Angers, pour votre aide, vos conseils et votre soutien sans faille.

Je remercie aussi SCAAP Kiwifruit (plus particulièrement Emmanuelle Pancou et François Lafitte) et le Bureau Interprofessionnel du Kiwi français (BIK) pour leur soutien technique et financier.

En espérant n'avoir oublié personne, et si c'est le cas *mea culpa*, je vais poursuivre ma démonstration de reconnaissances envers des personnes qui me sont très chères. Je remercie ma copine Stéphanie pour son soutien et ses conseils, et oui maintenant je vais avoir plus de temps pour venir voir ta petite tribu. Un merci à ma Mamie Simone qui nous a quittés trop tôt, quelques années avant ma thèse. Tu as toujours cru en moi et soutenue dans

mes études. Je suis certaine que tu aurais été fière de moi pour la thèse, même s'il doit rester des fautes dans le manuscrit car il n'aura pas pu passer entre tes mains. Un grand merci à mes grandes sœurs Natacha et Maud, pour leur écoute, leur soutien et tous ces conseils qui m'aident à faire sortir le meilleur de moi-même. J'ai de la chance de vous avoir et de savoir que je peux toujours compter sur vous. Je remercie énormément mes parents de m'avoir toujours soutenu et encouragé à poursuivre et suivre les études que je voulais. Vous avez su prêter une oreille attentive et vous êtes toujours intéressés à mes projets professionnels en cherchant à comprendre sur quoi reposaient mes recherches, ce qui m'a toujours donné la force d'aller toujours plus loin. Merci à mes sœurs et mes parents pour votre soutien lors de la rédaction et pour toutes ces heures passées au téléphone. Et puis je finirai par le dernier, et non le moindre, mon Cyril. Tu as su me supporter (dans les deux sens du terme !!!) durant ces 3 ans. Maintenant nous allons pouvoir reprendre une vie sociale le week-end, même si Poupougne commençait à s'habituer à ses permissions de 2h du mat ces derniers temps. Ton soutien fut sans faille et ta présence une grande force pour moi. Merci pour ta générosité, ta gentillesse, ces parties de scrabble qui m'ont aidées à me vider la tête, et pour tout ce que tu m'apportes au quotidien. Quelle joie de t'avoir dans ma vie.

Il ne me reste qu'une chose à dire (plagiat d'un slogan publicitaire passé sur France Inter il y a quelques années) : « moi je dis oui au kiwi » !

Table des matières

CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	15
1. Introduction générale sur les émergences bactériennes	16
1.1. Généralités sur les émergences de bactéries phytopathogènes.....	16
1.2. Les différents scénarios d'émergence	17
1.2.1. Adaptation à un nouvel hôte	17
1.2.2. Modification des traits de l'agressivité sur un même hôte	18
1.2.3. Colonisation d'une nouvelle aire géographique	19
1.3. Le rôle de la biosurveillance.....	20
2. Le Kiwi.....	22
2.1. Historique de la domestication du kiwi et données économiques	22
2.1.1. La Chine : berceau du kiwi.....	22
2.1.2. Nouvelle-Zélande : berceau de la commercialisation du kiwi	22
2.1.3. Développement de la culture du kiwi en France	23
2.1.4. Développement de la culture du kiwi dans le reste du monde	24
2.1.5. « Top ten » des pays producteurs de kiwi	24
2.2. Eléments de botanique	24
2.2.1. Taxonomie	24
2.2.2. Physiologie, mode de reproduction et cycle annuel.....	25
a. Physiologie.....	25
b. Mode de reproduction	25
c. Cycle annuel	25
2.3. Conduite de culture et multiplication.....	26
2.3.1. Morphologie de la plante	26
2.3.2. Méthodes de propagation	26
2.3.3. Optimisation de la pollinisation	26
2.3.4. Climat et propriétés pédologiques.....	27
2.4. Les agents pathogènes du kiwi	27

2.4.1.	Bactéries.....	27
2.4.2.	Autres agents pathogènes du kiwi.....	28
a.	Nématodes.....	28
b.	Insectes.....	28
c.	Virus.....	29
d.	Champignons.....	29
3.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>, le chancre bactérien du kiwi.....	31
3.1.	Caractérisation biologique et taxonomie.....	31
3.1.1.	Caractérisation biologique.....	31
3.1.2.	Taxonomie de <i>Psa</i>	31
a.	Concept de l'espèce bactérienne.....	32
b.	Sous-division de l'espèce ou sous-espèce.....	32
3.1.3.	Histoire de la taxonomie des <i>Pseudomonas syringae</i>	33
3.1.4.	Positionnement de <i>Psa</i> au sein de la taxonomie des <i>P. syringae</i>	36
3.2.	Symptômes, gamme d'hôtes, cycle de la maladie et voies de dissémination.....	37
3.2.1.	Symptômes et gamme d'hôtes.....	37
a.	Généralités sur les symptômes provoqués par les <i>P. syringae</i>	37
b.	Symptômes caractéristiques de <i>Psa</i>	38
c.	Gamme d'hôtes de <i>Psa</i>	38
3.2.2.	Cycle de la maladie.....	39
a.	Généralités sur les phases épiphyte et pathogènes chez les <i>P. syringae</i>	39
b.	Cycle de la maladie sur kiwi due à <i>Psa</i>	41
3.2.3.	Voies d'entrées et de dissémination de <i>Psa</i>	42
a.	Voies d'entrée.....	42
b.	Voies de dissémination de <i>Psa</i>	42
3.3.	Mécanismes de l'interaction plante-bactérie : les facteurs de virulence.....	45
3.3.1.	Les interactions plante-bactérie.....	45
3.3.2.	Système de sécrétion de type III et effecteurs de type III.....	47
a.	Généralités sur le système de sécrétion de type III ou SST3.....	47
b.	Généralités sur les effecteurs de type III ou ET3s.....	48
c.	SST3 et effecteurs chez <i>Psa</i>	49

3.3.3.	Autres facteurs contribuant à la virulence	49
a.	Les toxines.....	49
b.	Pouvoir glaçogène.....	50
c.	Élément conjugatif et intégratif (ICE).....	51
3.4.	Méthodes de lutte contre le chancre bactérien du kiwi, <i>Psa</i>	52
a.	Lutte préventive : conduites culturales	52
b.	Bactéricides : traitements cupriques, antibiotiques et autre produits chimiques...	53
c.	Lutte biologique : Bactériophages et antagonistes.....	54
d.	Stimulateurs de défense	55
e.	Lutte génétique : création de variétés plus tolérantes ou résistantes.....	55
4.	Biosurveillance de <i>Psa</i>	57
4.1.	Outils de diagnostic et de détection	57
4.1.1.	Diagnostic au champ	57
4.1.2.	Diagnostic et tests de détection en laboratoire.....	58
a.	Caractérisation biologique : morphologie et phénotype.....	58
b.	Caractérisation moléculaire	59
4.1.3.	Caractérisation des critères de performance d'un outil en vue de sa validation	62
4.2.	Diversité génétique et études épidémiologiques de <i>Psa</i>	62
4.2.1.	Historique des épidémies de <i>Psa</i>	62
a.	Première épidémie : <i>Psa</i> biovar 1	63
b.	Deuxième épidémie : <i>Psa</i> biovar 2	63
c.	Troisième épidémie qualifiée de pandémie: <i>Psa</i> biovar 3	64
d.	Quatrième épidémie : <i>Psa</i> biovar 4	65
4.2.2.	Etude de la diversité des souches de <i>Psa</i> par des techniques basées sur la PCR	65
4.2.3.	Recherche de l'origine de l'épidémie par génomique comparative.....	66
4.2.4.	Retracer les routes des épidémies	68
4.3.	Réglementation de <i>Psa</i> en Europe et en France	69
5.	Objectifs de la thèse	71

CHAPITRE II. RESULTATS	72
1. Deux bactéries pathogènes du kiwi identifiés en France	73
1.1. Résumé de l'article.....	73
1.1.1. Introduction.....	73
1.1.2. Méthodologie	73
1.1.3. Résultats et discussion	74
1.1.4. Conclusion	75
1.2. Publication	75
2. Identification de l'origine de l'épidémie de <i>Psa</i> biovar 3 en France par MLVA.....	76
2.1. Résumé de l'article.....	76
2.1.1. Introduction.....	76
2.1.2. Méthodologie	76
2.1.3. Résultats et discussion	77
2.1.4. Conclusion	78
2.2. Publication	78
3. Développement d'un outil de détection de PCR en temps réel de <i>Psa</i> et <i>Psaf</i>.....	79
3.1. Résumé.....	79
3.1.1. Introduction.....	79
3.1.2. Méthodologie	79
3.1.3. Résultats et discussion	80
3.1.4. Conclusion	81
3.2. Publications.....	83
3.2.1. Genome announcement	83
3.2.2. Développement d'un outil de détection par PCR temps réel de <i>Psa</i> et <i>Psaf</i>	89
CHAPITRE III. DISCUSSION GENERALE.....	107
1. Une pierre apportée à l'édifice de la taxonomie des <i>Pseudomonas syringae</i>	109
1.1. Description d'un nouveau pathovar au sein des <i>Pseudomonas syringae</i> :	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidifoliorum</i>	109
1.2. Hypothèses sur l'histoire, l'origine et la répartition de <i>Psaf</i>	110

1.3.	L'importance de la dénomination des bactéries en phytopathologie	111
1.4.	Quel est le lien entre les pathovars <i>actinidiae</i> et <i>theae</i> ?	112
2.	De nouveaux éléments sur la biologie de <i>Psa</i>	114
2.1.	Gamme d'hôtes du pathovar <i>actinidiae</i>	114
2.2.	<i>Psa</i> , une bactérie du xylème qui prend racine ?.....	115
3.	Les apports des travaux dans la lutte et la réglementation des bactéries pathogènes du kiwi	116
3.1.	Adaptation des méthodes de lutte au champ	116
3.2.	Evolution de la réglementation à la lumière de la description de <i>Psaf</i>	117
4.	La contribution des travaux à l'amélioration de l'épidémiosurveillance.....	118
4.1.	Un schéma MLVA adapté pour étudier la structuration des populations de <i>Psa</i> biovar 3 isolées dans le monde.....	118
4.2.	Développement d'une PCR temps réel permettant une détection spécifique de chaque biovar de <i>Psa</i> et de <i>Psaf</i>	121
5.	Perspectives	123
5.1.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	123
5.2.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidifoliorum</i>	124
	Bibliographie	125
	Annexe	148

Table des illustrations

Figure 1-1 : Aperçu schématique de l'analyse des maladies infectieuses émergentes.

Figure 2-1 : Carte des Provinces de Chine.

Figure 2-2 : Répartition de la production de kiwi (en tonnes) en France en 2012.

Figure 2-3 : Photo présentant 16 espèces d'*Actinidia* et mettant en évidence la palette de formes, de couleurs et de textures distinguées au sein d'*Actinidia*.

Figure 2-4 : Photo illustrant la diversité de couleurs de chairs de fruits de différentes variétés de kiwi.

Figure 2-5 : Morphologie de la plante.

Figure 2-6 : Photo de chancre sur bois causé par *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidiae* sur *Actinidia*.

Figure 2-7 : Photos de symptômes de *Pseudomonas viridiflava* sur *A. chinensis* Planchon.

Figure 2-8 : Photo de galles sur racines d'*Actinidia* causées par *Meloidogyne*.

Figure 2-9 : Photos de mouches des fruits présentant un danger potentiel pour la culture du kiwi.

Figure 2-10 : Photos de symptômes associés au CLRV et PZSV *A. chinensis* cv. Hort16A.

Figure 2-11 : Photo de symptômes sur bois dus à *Fomitiporia mediterranea* sur *Actinidia*.

Figure 3-1 : Photo de colonies de *Psa* sur milieu B de King.

Figure 3-2 : Comparaison des morphologies des quatre biovars de *Psa* sur milieu nutritif agar (Oxoid) supplémenté de sucrose (3%) (NAS).

Figure 3-3 : Espèces et pathovars au sein de *P. syringae* sensu lato distingués au sein de phylogroupes ou genomospecies.

Figure 3-4 : Arbres phylogénétiques Bayésien construits avec la concaténation des séquences partielles de sept gènes de ménage (*acn*, *gapA*, *gltA*, *gyrB*, *pfk*, *pgi* et *rpoD*).

Figure 3-5 : Arbre phylogénétique construit en Neighbour Joining avec la concaténation des séquences de quatre gènes de ménage (*gapA*, *gltA*, *gyrB*, et *rpoD*).

Figure 3-6 : Photos de symptômes causés par des *P. syringae*.

Figure 3-7 : Photos des différents symptômes causés par *Psa* sur *Actinidia*.

Figure 3-8 : Observation au microscope électronique à balayage de feuille de pommier 6 jours après inoculation avec une souche pathogène de *P. syringae* pv. *syringae*.

Figure 3-9 : Schéma du cycle de la maladie du chancre bactérien du kiwi due à *Psa*.

Figure 3-10 : Photos de la localisation de souches de *Psa* transformées avec un plasmide exprimant la GFP dans les stomates et dans le xyleme d'*A. chinensis* et d'*A. deliciosa*.

Figure 3-11 : Photo représentative de la technique de "girdling" utilisée pour favoriser la productivité de la plante.

Figure 3-12 : La relation R/Avr : l'hypothèse « gène pour gène » (Flor, 1971).

Figure 3-13 : Modèle en zigzag de la coévolution du système immunitaire des plantes et du système de virulence des agents pathogènes.

Figure 3-14 : Schéma de la structure du SST3 chez les bactéries.

Figure 3-15 : Distribution des effecteurs de type 3 chez *Psa*.

Figure 3-16 : Test illustrant l'INA de souches de *P. syringae* pathogènes du haricot.

Figure 3-17 : Comparaison des alignements des séquences des trois ICEs décrits chez *Psa* biovar 3.

Figure 4-1 : Echelle de notation des symptômes observés sur feuilles d'*Actinidia deliciosa* 'Bruno' après inoculation par pulvérisation de souche de *Psa* à 109 UFC/mL.

Figure 4-2 : Schéma de l'hydrolyse de la sonde Taqman.

Figure 4-3 : Cartes représentant les pays producteurs de kiwi touchés par *Psa* au niveau mondial.

Figure 4-4 : Photos de gels d'agarose des résultats d'amplifications de souches de *Psa* avec les méthodes de BOX-PCR et d'ERIC-PCR.

Figure 4-5 : Représentation des différents types et catégories de TR.

Table des tableaux

Tableau 2-1 : Classement des dix premiers pays producteurs de kiwi en fonction du volume de production (milliers de tonnes).

Tableau 3-1 : Principaux tests biochimiques et PCRs permettant de distinguer les quatre biovars de *Psa* entre eux.

Tableau 3-2 : Niveaux de résolution des techniques utilisées en taxonomie bactérienne.

Tableau 4-1 : Tableau bilan récapitulatif des PCRs développées dans le cadre de la détection de *Psa*.

Tableau 4-2 : Noms utilisés pour nommer les souches de *Psa* depuis 2010.

Tableau 4-3 : Liste des génomes de souches de *Psa* séquencés et déposés sur GenBank.

Tableau 4-4 : Nombre de SNPs distincts identifiés sur un total de 3 453 192 pb, par comparaison de 9 souches de *Psa* deux à deux.

Tableau 4-5 : Recensement des études MLVA menées sur des bactéries pathogènes de plantes.

Lexique

<i>acn</i>	aconitate hydratase B
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AMP	AntiMicrobial Peptide
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
avr	avirulence
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CDS	Coding DNA Sequence
UFC	Unité Formant Colonie
CFBP	Collection Française de Bactéries associées aux Plantes
CPP	Comité Permanent Phytosanitaire
cv	cultivar
DAPC	Discriminant Analysis in Principal Components
dNTP	désoxy Nucleotide TriPhosphate
EILV	Essais Inter Laboratoires de Validation
EPS	ExoPolySaccharide
ERIC-PCR	Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus – PCR
ETI	Effector-Trigger Immunity
FREDON	Fédération Régionale de Défense contre les Organismes Nuisibles
<i>gapA</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<i>gltA</i>	citrate synthase
<i>gyrB</i>	B DNA gyrase
HR	Hypersensitive Response
<i>hrc</i>	<i>hrp</i> conserved
<i>hrp</i>	hypersensitive response and pathogenicity
ICE	Integrative and Conjugative Element
ICMP	International Collection of Microorganisms from Plants
INA	Ice Nucleation Activity
INRA	Institut National pour la Recherche Agronomique
ITS	Intergenic Transcription Space
LPS	LipoPolySaccharide
LSV	Laboratoire de la Santé des Végétaux
MAMP	Microbe-Associated Molecular Pattern
MLSA	MultiLocus Sequence Analysis

MLST	MultiLocus Sequence Typing
MLVA	Multilocus Variable number of tandem repeats Analysis
MST	Minimum Spanning Tree
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NJ	Neighbor Joining
OEPP	Organisation Européenne et méditerranéenne pour la Protection des Plantes
ORF	Open Reading Frame
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
pb, kb, Mb	paire de base, kilobase, Mégabase
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>pfk</i>	phosphofruktokinase
<i>pgi</i>	phosphoglucoisomerase
PPE	Passeport Phytosanitaire Européen
PPRs	Pattern-Recognition Receptors
Psa	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>
Psaf	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidifoliorum</i>
pv	pathovar
R	Résistance
RAPD	Random Amplified Polymorphic
REP	Repetitive Extragenic Palindrom
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
<i>rpoD</i>	sigma factor 70
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SRAL	Service Régional de l'Alimentation
ET3	Effecteur de Type 3
SS T3	Système de secretion de Type 3
Tm	melting Temperature
TR	Tandem Repeat
UE	Union Européenne
UV	Ultra-Violet
VNTR	Variable Number of Tandem repeats

Chapitre I. Synthèse bibliographique

1. Introduction générale sur les émergences bactériennes

Depuis l'Antiquité, les épidémies concernant l'homme, les épizooties concernant l'animal et les épiphyties ayant trait à la plante, marquent l'Histoire comme par exemple la peste noire qui a ravagé l'Europe au 14^e siècle, la variole au 16^e siècle en Amérique du Sud, le choléra, la grippe ou le sida pour les zoonoses (maladies transmises des animaux vers les humains, et inversement); la peste bovine ou la rage pour les épizooties (maladies qui touchent simultanément un grand nombre d'animaux, de la même espèce ou d'espèces différentes); la graphiose de l'orme ou le mildiou de la pomme de terre pour les épiphyties. Une maladie est qualifiée d'émergente si elle est récemment devenue un sujet de préoccupation en raison d'une augmentation de son incidence, de l'infection d'un nouvel hôte, et / ou de son apparition dans une nouvelle zone géographique (Giraud *et al.*, 2010). Les maladies émergentes sont en augmentation depuis les années 80, dans un monde globalisé où la multiplication des échanges et la rapidité des transports contribuent à diffuser rapidement les agents infectieux.

1.1. Généralités sur les émergences de bactéries phytopathogènes

Le développement de l'agriculture, avec la domestication d'espèces végétales et de leurs pathogènes associés, est très récent et a débuté il y a environ 10 000 ans (Balzer *et al.*, 2007). La perte ou la modification de la biodiversité, due à la modification des écosystèmes par l'anthropisation (utilisation d'espèces végétales génétiquement uniformes, extension des monocultures sur des surfaces de plus en plus grandes et homogénéisation des conditions environnementales (irrigation, intrants plus spécifiques, produits phytosanitaires, ...)), contribue à faciliter la transmission d'agents pathogènes d'hôte en hôte et à favoriser l'émergence d'agents pathogènes plus spécialisés et plus agressifs (Daszak *et al.*, 2000, Stukenbrock & McDonald, 2008). Mais les compartiments cultivés ne représentent pas les seuls réservoirs de futures émergences, les compartiments non-agricoles sont aussi considérés comme des réservoirs de populations pathogènes. Les compartiments non-agricoles abritent des populations bactériennes présentant une plus grande diversité génétique et une plus large gamme de plantes hôtes que les populations bactériennes pathogènes de culture, comme il l'a été démontré par Monteil et collègues pour *Pseudomonas syringae* (Monteil *et al.*, 2013).

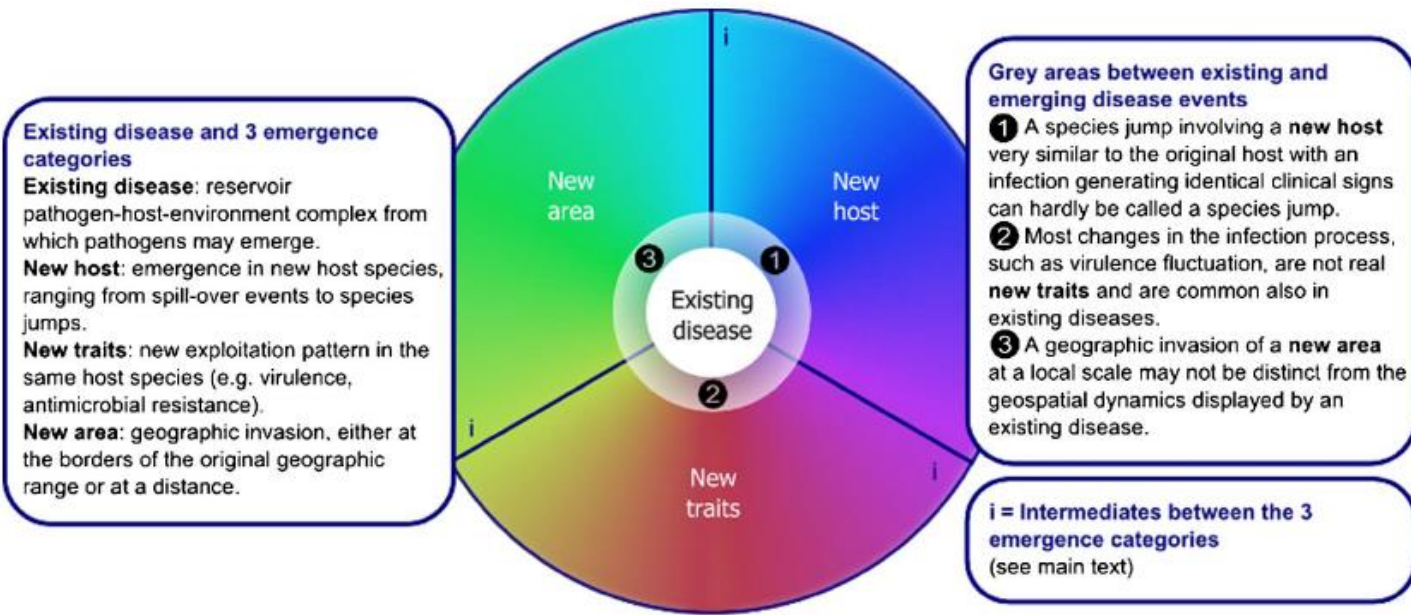


Figure 1-1 Aperçu schématique de l'analyse des maladies infectieuses émergentes. Le spectre aux couleurs de l'arc-en-ciel reflète le panel de toutes les possibilités de scénarios de nouvelles maladies émergentes, qui sont catégorisées avec un nouvel hôte (New host), de nouveaux traits (New traits) ou une nouvelle aire (new area), à partir de maladies déjà existantes (Existing disease). Les numéros 1 à 3 indiquent les mécanismes en jeu dans l'apparition de la nouvelle émergence. i: représente les niveaux intermédiaires qui relient les catégories d'émergences entre elles. D'après Engering *et al.*, 2013.

C'est à partir du réservoir de maladies déjà existantes que vont naître les émergences selon trois scénarios (Figure 1-1) (Engering *et al.*, 2013), tels que :

- adaptation à un nouvel hôte ;
- acquisition de nouveaux traits, conférant à l'agent pathogène une plus grande agressivité ou lui permettant de mieux contourner le système de défense de son hôte;
- colonisation d'une nouvelle aire géographique.

Cette catégorisation n'est pas figée, des niveaux intermédiaires existent (Figure 1-1) (Engering *et al.*, 2013). Par exemple, un agent pathogène adapté à une nouvelle espèce hôte peut ensuite coloniser une nouvelle aire géographique. De même, l'acquisition de nouveaux traits d'un agent pathogène, devenant plus agressif pour son hôte de prédilection, peut lui permettre également de coloniser un nouvel hôte ou une nouvelle aire géographique.

1.2. Les différents scénarios d'émergence

1.2.1. Adaptation à un nouvel hôte

L'adaptation à un nouvel hôte requiert d'une part que l'agent pathogène ait évolué et dispose des armes nécessaires pour l'infecter et y persister, et d'autre part que l'agent pathogène ait été mis en contact avec son nouvel hôte. Les mécanismes liés à l'acquisition de nouveaux traits en lien avec l'agressivité sont discutés dans la partie suivante (1.2.2).

La mise en contact d'un agent pathogène avec un nouvel hôte est majoritairement favorisée par l'anthropisation des environnements naturels (introduction de nouvelles espèces végétales, pratiques culturelles et modification des habitats naturels) (Anderson *et al.*, 2004, Stukenbrock & McDonald, 2008). Lorsqu'un pathogène colonise une nouvelle gamme d'hôtes jusqu'alors non infectée, cet événement est qualifié de saut d'hôte ou host jump. L'adaptation d'un pathogène sur une nouvelle espèce hôte implique une infection réussie, une multiplication dans la nouvelle espèce hôte et conduit à une nouvelle transmission d'hôte en hôte (Woolhouse *et al.*, 2005, Engering *et al.*, 2013).

Ce scénario d'adaptation à un nouvel hôte peut être illustré par l'observation de souches de *Xanthomonas vasicola*, pathogènes de la canne à sucre, devenues pathogènes de l'eucalyptus en Afrique du sud (Coutinho *et al.*, 2015). Les souches ont été isolées à partir d'une plantation d'eucalyptus récemment installée dans une zone de production intensive de canne à sucre. Le rapprochement géographique de deux cultures aurait favorisé le saut d'hôte

d'un agent pathogène de la canne à sucre, à un nouvel hôte jamais décrit auparavant : l'eucalyptus.

1.2.2. Modification des traits de l'agressivité sur un même hôte

Les procaryotes se reproduisent de façon asexuée, par mitose le génome bactérien est multiplié par deux et réparti équitablement dans la cellule mère et la cellule fille. Les mutations sont génératrices de variabilité génétique mais elles ne représentent pas le seul mécanisme d'évolution chez les bactéries. Pour acquérir rapidement de la diversité, les bactéries ont mis en place des mécanismes leur permettant d'échanger de l'ADN avec d'autres individus bactériens afin d'enrichir leur pool de gènes accessoires (moins indispensables à la survie de la bactérie, à l'inverse des gènes « core »). Le transfert de gènes, parmi et entre des populations bactériennes, peut se faire au travers de trois mécanismes différents : par conjugaison (transfert de gènes de bactérie à bactérie par l'intermédiaire de plasmides ou d'éléments conjugatifs et intégratifs), par transduction (transfert par l'intermédiaire d'un bactériophage) et par transformation (absorption d'ADN directement de l'environnement). Tous ces processus vont permettre, entre autres, d'inclure dans le génome de l'ADN qui va modifier l'agressivité, la fitness ou la résistance aux agents antimicrobiens, favorisant ainsi le contournement des mécanismes de défense mis en place par l'hôte ou les itinéraires techniques (tels que les traitements antimicrobiens). Le transfert horizontal de gènes peut permettre l'acquisition de plusieurs gènes disposés les uns à la suite des autres, appelés aussi îlot de pathogénie (pathogenic island). Cet événement peut avoir lieu entre espèces, entre genres ou même entre règnes différents, favorisant alors l'émergence de souches plus agressives pouvant parfois infecter une plus large gamme de plantes hôtes (Thynne *et al.*, 2015).

L'utilisation de traitements antimicrobiens en agriculture, ainsi que les pratiques culturales (monoculture) sont des facteurs déclencheurs et accélérateurs de l'évolution des bactéries phytopathogènes. Ces facteurs, qui vont exercer une forte pression de sélection, peuvent favoriser la sélection de nouvelles souches plus agressives, plus résistantes et avec une meilleure fitness (Engering *et al.*, 2013).

Ce scénario d'émergence lié à l'acquisition de nouveaux traits en lien avec l'agressivité est bien illustré pour le complexe des *Pseudomonas syringae sensu lato*. Il semblerait que l'acquisition, par transfert horizontal, du système de sécrétion de type III (SST3), puis d'effecteurs de type 3 (ET3) (voir partie 3.3.2), aurait permis aux bactéries de coloniser de

nouvelles niches et de nouveaux hôtes (Alfano *et al.*, 2000, Deng *et al.*, 2003). De même, il a été démontré que dans l'environnement il existe des souches non pathogènes, telle que *Pseudomonas syringae* 508, qui ne possèdent ni système de sécrétion de type III ni d'effecteurs de type 3 (Mohr *et al.*, 2008). Lorsque les chercheurs ont transformé la souche *Pseudomonas syringae* 508 avec un plasmide portant les gènes codant pour le SST3 et le gène de l'effecteur *hopAI*, sa vitesse de croissance *in planta* a été multipliée par 10. Ceci montre l'influence de ces gènes sur la fitness de la bactérie.

1.2.3. Colonisation d'une nouvelle aire géographique

L'expansion de la répartition des agents pathogènes va leur permettre d'avoir accès à de nouvelles aires, ou de nouvelles ressources, au travers de la dispersion par sauts, aussi appelée « sauts géographiques ». Ces sauts géographiques vont permettre une dissémination rapide de l'agent pathogène et sont représentatifs de la majorité des épidémies (Engering *et al.*, 2013).

Les facteurs qui favorisent la colonisation d'aires géographiques à plus ou moins longues distances sont multiples. Les changements climatiques peuvent impacter les populations d'insectes vecteurs qui vont être adaptés à de nouvelles aires géographiques, profitant ainsi aux agents pathogènes qui y sont associés. L'intensification des échanges commerciaux de produits agricoles (semences, plants,...) à l'international favorise l'introduction d'agents pathogènes dans de nouvelles zones.

Nous pouvons citer ici l'exemple de *Xylella fastidiosa*, l'agent responsable de la maladie de Pierce sur la vigne qui a été détectée dans les années 1880 en Californie. Depuis longtemps cette bactérie pathogène était présumée comme endémique aux Etats-Unis. Mais des analyses de génomique comparative ont contredit cette hypothèse, en mettant en évidence que les souches sont les descendantes d'un génotype qui aurait été introduit d'Amérique centrale, très probablement à partir d'un caféier infecté (Nunney *et al.*, 2010). Cet exemple illustre bien comment un agent pathogène émergent a colonisé une nouvelle aire géographique via l'importation de matériel végétal.

Un autre exemple très représentatif de la colonisation d'une nouvelle aire géographique est *Xanthomonas citri* pv. *citri* (*XCC*). *XCC* est l'agent responsable du chancre asiatique des agrumes et représente une contrainte dans la plupart des pays producteurs d'agrumes à l'échelle mondiale (Graham *et al.*, 2004). L'étude d'une collection de souches représentatives de la diversité génétique et pathogénique de *XCC* au niveau mondial par MLVA (Multilocus Variable number of tandem repeats analysis) et DAPC (Discriminant

Analysis of Principal Components) (voir partie 4.2.4) a permis d'identifier un cluster de souches (isolées dans presque toutes les régions du monde où le chancre asiatique des agrumes est présent) comme étant responsable de l'expansion géographique majeure de *XCC* durant le XX^{ème} siècle (Pruvost *et al.*, 2014).

La colonisation de nouvelles aires géographiques via les échanges commerciaux des produits végétaux est certainement le facteur le plus important responsable de l'émergence d'organismes nuisibles des végétaux à l'échelle géographique mondiale.

1.3. Le rôle de la biosurveillance

Il est primordial de mutualiser les informations à l'international quant à la détection de nouveaux agents pathogènes, une surveillance à l'échelle mondiale étant indispensable. La communauté internationale a élaboré des règles communes pour éviter la dissémination des organismes agricoles nuisibles. A ce jour, le monde est divisé en 8 régions où interviennent des organisations intergouvernementales chargées de la coopération dans le domaine de la protection des plantes et du suivi des organismes nuisibles. Ces organisations sont les suivantes :

- La **Commission phytosanitaire pour l'Asie et le Pacifique (APPPC)** [<http://www.apppc.org/>] : créée en 1956, elle regroupe 24 pays d'Asie du Sud Est et d'Australasie.
- La **Communauté andine (CA)** [www.ippc.int/index.php?id=ca&no_cache=1&L=2] : créée en 1969, elle regroupe 4 pays (Bolivie, Colombie, Equateur et Pérou).
- Le **Comité de protection des plantes du Cône Sud (COSAVE)** [<http://www.cosave.org/pagina/bienvenidos-al-comite-de-sanidad-vegetal-cosave>] : créé en 1989, il regroupe 5 pays (Argentine, Brésil, Chili, Paraguay et Uruguay).
- **L'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (OEPP)** [<http://www.eppo.int/>] : créée en 1951, elle regroupe 50 pays représentant pratiquement tous les pays de la région européenne et méditerranéenne.
- Le **Conseil phytosanitaire interafricain (CPI)** [www.au-iapsc.org] : créé en 1954, il regroupe 18 pays du continent africain.
- **L'Organisation nord-américaine pour la protection des plantes (NAPPO)** [<http://www.nappo.org/>] : créée en 1952, elle regroupe 3 pays (Canada, Etats-Unis et Mexique).

- **L'Organisme international régional contre les maladies des plantes et des animaux (OIRSA)** [<http://www.oirsa.org/portal/index.html>] : créé en 1953, il regroupe 9 pays d'Amérique Latine.
- **L'Organisation de protection des végétaux pour le Pacifique (PPPO)** [<https://www.ippc.int/en/?id=13528>] : créée en 1994, elle regroupe 22 pays de la zone Pacifique.

La France participe à quatre de ces organisations : APPPC, CPPC, OEPP et PPPO.

Outre ces organismes internationaux chargés de la coopération dans le domaine de la protection des plantes, il existe des dispositifs nationaux propres à chaque état. Au niveau français, un système régional décentralisé articulé autour des Services Régionaux de l'Alimentation (SRAL) prend en charge la protection des cultures et la surveillance du territoire vis-à-vis des organismes de quarantaine.

Le Laboratoire de la Santé des Végétaux (LSV), structure qui dépend de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'Alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), est un Laboratoire National de Référence (LNR) reconnu au travers de ses mandats. Le LSV intervient dans le cadre de la gestion de crises sanitaires associées aux végétaux, dans l'évaluation des risques en matière de santé des végétaux, dans le développement de méthodes officielles de détection et de diagnostic des organismes de quarantaine, ainsi que pour l'animation d'un réseau de laboratoires agréés pour effectuer les analyses officielles (analyses liées à la surveillance du territoire).

En France, un réseau d'épidémiosurveillance permet de collecter des informations en temps réel sur les risques ou les seuils de nuisibilité aux végétaux. Ces informations sont mises à la disposition de tous sous la forme de bulletin de santé du végétal (BSV).



Figure 2-1 : Carte des Provinces de Chine.

Cercle rouge: localisation du fleuve Yang-Tsé-Kiang (ou Yangtze River sur la carte); cercle bleu: Province de Jiangxi; cercle violet: Province de Zhejiang.

Source <http://www.china-mike.com/china-travel-tips/tourist-maps/china-provinces-map/>

2. Le Kiwi

2.1. Historique de la domestication du kiwi et données économiques

2.1.1. La Chine : berceau du kiwi

Le Yangtao (nom chinois du kiwi) pousse spontanément en Chine dans les zones montagneuses qui longent le Yang-Tsé-Kiang (Figure 2-1). Les Hans de la vallée de Yang-Tsé-Kiang appréciaient déjà le tonus que fournissait ce fruit vert il y a des siècles. Etant une nourriture privilégiée des singes, il fut nommé « pêche à macaques » dans un recueil de poésie datant du X^{ème} siècle av. J.-C. Un fossile de feuille d'*Actinidia*, découvert dans la Province de Jiangxi (Figure 2-1) par des scientifiques de l'institut de géologie et paléontologie de Nanjing, a permis de dater cette plante à l'époque du Miocène, elle serait âgée de 26 à 20 millions d'années (Qian, 1991).

Le père jésuite français Pierre Nicolas Le Chéron d'Incarville fut le premier à rapporter le *Yangtao* en France après avoir passé 17 ans à la cour impériale de l'Empereur de Chine de 1740 à 1757. Ce n'est que 100 ans après, que l'anglais John Lindley décrit et nomme le genre *Actinidia* (« rayon » en grec) en 1826 et que le français Jules Planchon décrit et assigne le *Yangtao* à l'espèce : *Actinidia chinensis* Planchon en 1847.

Même si l'essentiel de la diversité d'*Actinidia* est localisée en Chine, quelques espèces se trouvent à l'état sauvage dans d'autres pays d'Asie limitrophes: Corée, Japon, Thaïlande, Inde, Malaisie, Vietnam, Sibérie et Himalaya (Lespinasse & Leterne, 2005). La culture de l'*Actinidia* en Chine a débuté il y a 300 ans dans le Comté de Huang Yan, Province de Zhejiang (Figure 2-1) (Qian, 1991).

2.1.2. Nouvelle-Zélande : berceau de la commercialisation du kiwi

La Nouvelle-Zélande fut le premier pays à développer la culture du kiwi. M Hayward Wright obtint des plants à partir d'un semis de graines chinoises. Il donna son nom à la variété obtenue 'Hayward', qui est aujourd'hui encore la plus répandue. Les premiers vergers de kiwi furent plantés dès les années 1940 à Te Puke dans la « Bay of Plenty », qui devint le berceau du kiwi néo-zélandais. Les premiers fruits furent exportés vers le marché britannique puis américain en 1952. La production s'est réellement développée dans les années 1960 avec pour objectif de conquérir les grands marchés d'exportation.

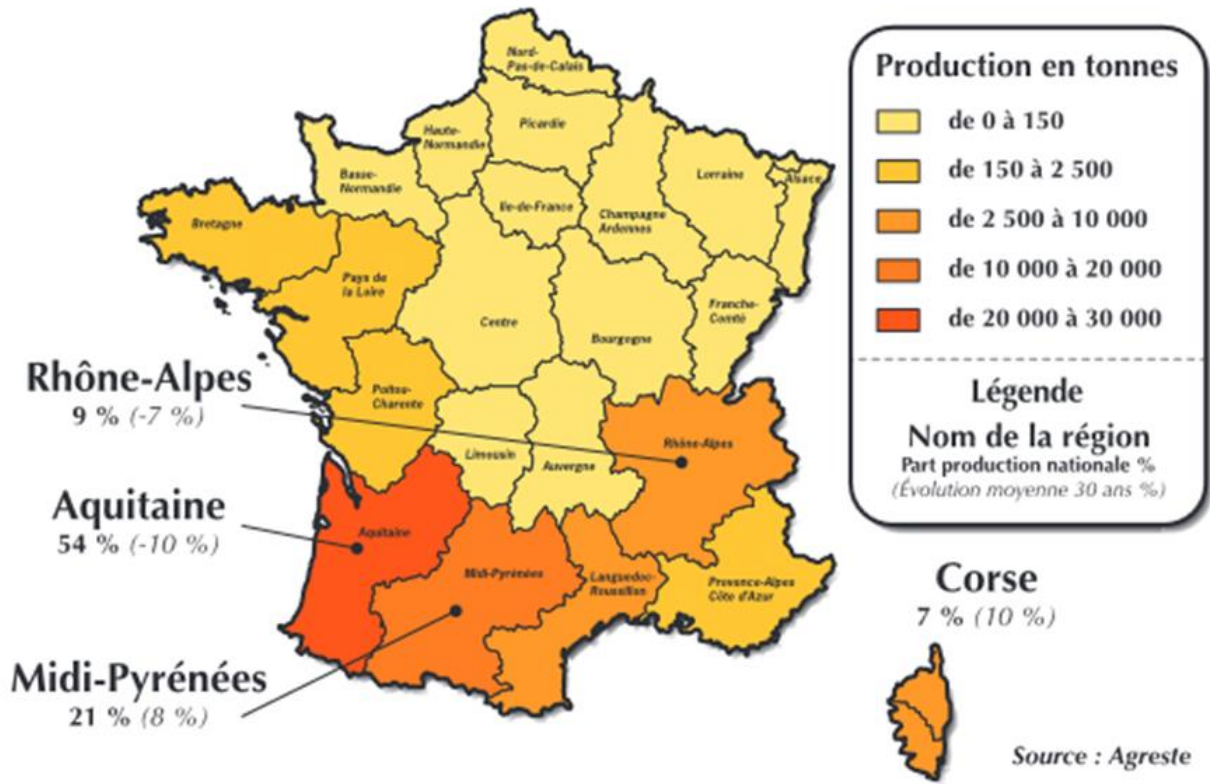


Figure 2-2 Répartition de la production de kiwi (en tonnes) en France en 2012.

D'après Froucht, 2014.

Au tout début des années 1970, les fruits trouvèrent leur place au rayon des fruits exotiques sous le nom de « Chinese goosberry » (groseille de Chine). C'est en suivant les conseils d'une cliente californienne que les néo-zélandais rebaptisèrent ce fruit du même nom que le nom maori de l'oiseau emblématique de Nouvelle-Zélande : « kiwi », la peau marron duveteuse du fruit rappelant le ramage de l'oiseau. Ce nom générique fut ensuite universellement adopté.

2.1.3. Développement de la culture du kiwi en France

Deux ingénieurs agronomes, Henri Pedelucq et Jean-Louis Soyez, et un architecte parisien, M. Rabinel, furent les premiers à s'intéresser à la culture du kiwi en France dans les années 1960 (Montahut, 2007). Henri Pedelucq acclimata des plants de kiwi dans le bassin de l'Adour, région des Landes, et M. Rabinel au domaine de Ribéron, en Gironde. Les deux essais furent concluants sur les deux sites. Henri Pedelucq importa par la suite de nombreux plants de Nouvelle-Zélande à la fin des années 1960, et quelques années plus tard la technique de bouturage permit de développer la production de plants en France. La première récolte à vocation commerciale fut de moins d'une tonne en 1972. La culture se développa par la suite dans la région de Perpignan, en Corse, dans les vallées du Rhône et de la Garonne pour atteindre son apogée dans les années 1980 dans presque toutes les régions fruitières de France. Le développement de la culture du kiwi est très lié à l'apparition du feu bactérien dans le sud-ouest qui décima les vergers de poiriers. Beaucoup d'arboriculteurs se détournèrent de la production de poires pour celle du kiwi, plante dépourvue de maladie, à l'époque. La commercialisation s'ouvrit aux marchés européens. Deux crises économiques successives, survenues au début des années 1990 vont faire disparaître de nombreux acteurs de la filière (cultivateurs et producteurs de plants). Mais depuis la fin des années 1990, la culture est repartie en France et de nouveaux vergers ont été mis en place. La commercialisation s'ouvre alors aux marchés internationaux (Amérique du nord, Asie, Moyen-Orient,...). L'implantation de nouveaux vergers fut favorisée par les dégâts causés par le virus de la Sharka dans des vergers de *Prunus* à la fin des années 1990. De nombreux producteurs se sont reconvertis dans la production du kiwi, notamment dans la vallée du Rhône et en Corse. A ce jour les principales régions productrices de kiwi sont le sud-ouest et le sud-est (Figure 2-2).

Rang	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pays	Chine	Italie	Nouvelle-Zélande	Chili	Grèce	Iran	France	Japon	Etats-Unis	Portugal
Production (milliers de tonnes)	1 150	416	323	203	121	80	61	37	26	18

Tableau 2-1 Classement des dix premiers pays producteurs de kiwi en fonction du volume de production (en milliers de tonnes).

D'après Belrose, 2015.

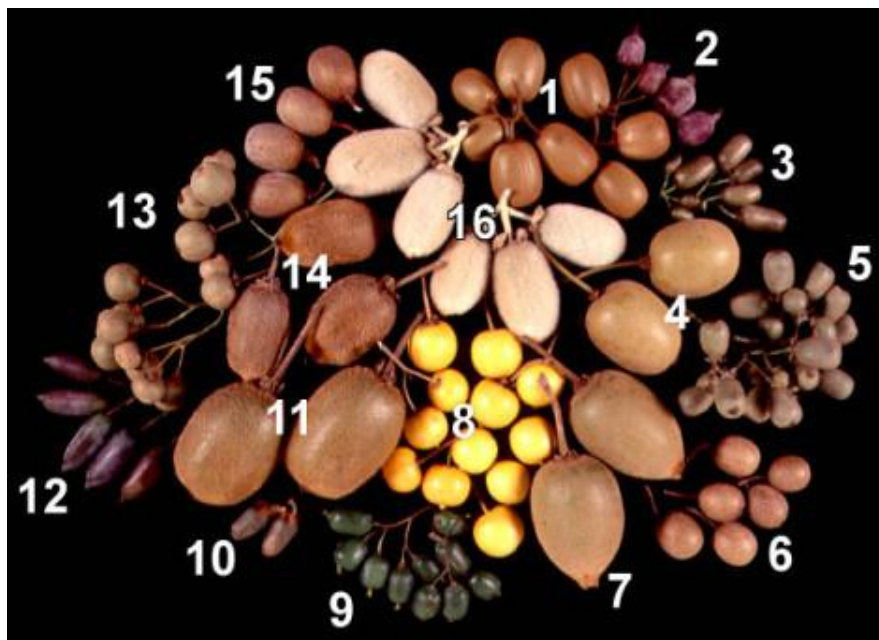


Figure 2-3 Photo présentant 16 espèces d'*Actinidia* et mettant en évidence la palette de formes, de couleurs et de textures distinguées au sein d'*Actinidia*.

1. *A. rufa*; 2. *A. melanandra*; 3. *A. glaucophylla*; 4. *A. chinensis*; 5. *A. latifolia*; 6. *A. indochinensis*; 7. *A. chinensis* "Zespri Gold"™ cv. Hort 16A"; 8. *A. macrosperma*; 9. *A. arguta*; 10. *A. fulvicoma*; 11. *A. deliciosa* "Hayward"; 12. *A. arguta* var. *purpurea*; 13. *A. guilinensis*; 14. *A. setosa*; 15. *A. chrysantha*; 16. *A. eriantha*.

D'après Photo by Martin Heffer (© HortResearch, New Zealand).

2.1.4. Développement de la culture du kiwi dans le reste du monde

C'est à la suite d'une visite de vergers dans le bassin de l'Adour (région des Landes) en 1976, que des producteurs italiens décidèrent de développer la culture du kiwi en Italie (Montahut, 2007). Ce développement fut favorisé dans les années 1980 par des aides régionales et des primes d'arrachage de plants de vigne.

Dans les années 1980 et 1990 la culture du kiwi va être implantée en Grèce, en Espagne, au Japon, en Corée du sud, en Chine, en Australie, aux Etats-Unis, en Iran et au Chili (Huang & Ferguson, 2001). On retrouve également des productions de kiwi en Allemagne, aux Pays-Bas, en Slovénie, au Portugal, en Turquie et en Afrique du sud.

2.1.5. « Top ten » des pays producteurs de kiwi

La production mondiale annuelle moyenne de kiwi de 2012 à ce jour est estimée à 2 573 298 tonnes, contre 1 516 808 entre 2002 et 2005, soit une augmentation de 67,7% (Belrose, 2015). Les principaux pays qui ont vu leur production croître ces dernières années sont la Chine, la Grèce et l'Iran avec une progression de plus de 100%. Le classement des dix premiers pays producteurs de kiwi, depuis 2012 jusqu'à aujourd'hui, est présenté dans le Tableau 2-1 (Belrose, 2015).

2.2. Eléments de botanique

2.2.1. Taxonomie

Appartenant à la famille des *Actinidiaceae*, le genre *Actinidia* regroupe 52 espèces en Chine et 55 au total dans le monde entier (Li *et al.*, 2007a, Li *et al.*, 2007b) (quelques espèces sont présentées sur la Figure 2-3). Au départ, *A. chinensis* décrit par Planchon en 1847 incluait les différentes espèces sans distinction. C'est en 1984 que Liang et Ferguson divisèrent *A. chinensis* en deux espèces botaniques : *A. chinensis* et *A. deliciosa* (Liang & Ferguson, 1984). La principale différence réside au niveau de la taille et la pilosité du fruit (Ferguson, 1990). Les fruits d'*A. chinensis* ne sont pas velus, à l'inverse de *A. deliciosa*. *A. arguta* se distingue des deux précédentes espèces de par la petite taille des fruits (25 mm de long), sa peau qui est comestible et de sa domestication plus récente (années 1990). Plus couramment, on parle d'*A. deliciosa* comme étant le kiwi à chair verte et *A. chinensis* le kiwi à chair jaune.



Figure 2-4 Photo illustrant la diversité de couleurs de chairs de fruits de différentes variétés de kiwi.

Photographe inconnu.

Dans chaque espèce commercialisée on distingue des cultivars tels que : ‘Hayward’, ‘Tomuri’, ‘Bruno’, ‘Solo’, par exemple. Le cultivar ‘Solo’, créé à l’issue de programmes de sélection, est auto-fertile et plus destiné aux particuliers qu’aux professionnels.

2.2.2. Physiologie, mode de reproduction et cycle annuel

a. Physiologie

Le kiwi est une liane lignifiée pouvant atteindre à l’état spontané jusqu’à 10 m de haut. Les jeunes feuilles et les branches sont recouvertes de poils rouges alors que les feuilles matures sont dépourvues de poils sur la surface supérieure. Les fruits peuvent être de forme ovale ou allongée (de 2,5 à 5 cm de long) et recouvert d’un duvet marron. La chair juteuse du fruit peut être de différentes couleurs et le centre (ou columelle) peut être blanc (Figure 2-4). Les pépins, de couleur noire, sont agencés sur deux rangées en périphérie de la columelle.

b. Mode de reproduction

Les kiwis sont généralement dioïques, les fleurs des plants mâles ne produisent que du pollen et celles des plants femelles seulement le gynécée qui va donner les fruits (les étamines sont stériles). La production de pollen est tellement importante qu’un seul pied mâle peut suffire à féconder en moyenne 4 pieds femelles. On peut trouver des espèces monoïques à l’état naturel, tel qu’*A. arguta*.

c. Cycle annuel

Dans l’hémisphère nord, le débourrement a lieu au printemps et la pollinisation (majoritairement entomophile), qui débute au mois de mai, est surtout réalisée par les abeilles. La floraison des pieds mâles est plus précoce que celle des pieds femelles (quelques jours d’écart). Les fruits grossissent durant l’été et sont récoltés en automne. Le repos végétatif s’opère durant l’hiver. En général la plante croît de 3 à 5 m par an.

Le kiwi commence à produire réellement à partir de sa 5^{ème} année pour atteindre son apogée au bout de 10 à 15 ans (30 à 60 kg par pied). Un kiwi vit en moyenne jusqu’à 30 ans.

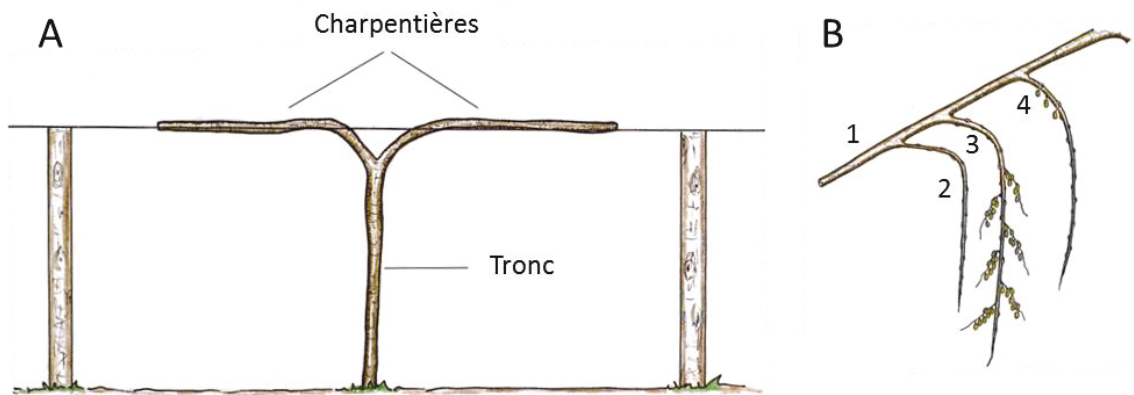


Figure 2-5 Morphologie de la plante.

A. Le tronc et ses charpentières. B. 1 : charpentière ; 2 : canne de l'année sans fruit ; 3 : canne et ses pousses fructifères (2^{ème} année) ; 4 : canne de l'année et sa première production.

D'après Lespinasse et Leterne, 2005.

2.3. Conduite de culture et multiplication

2.3.1. Morphologie de la plante

Afin de faciliter la conduite de culture et la récolte des fruits, des étapes successives de rabattage sont réalisées afin de séparer le tronc en deux charpentières (Figure 2-5 A). Des charpentières partent les rameaux latéraux aussi appelés cannes (ou pousses latérales) qui portent les pousses fructifères, les pousses de renouvellement et les gourmands (Figure 2-5 B) (Lespinasse & Leterne, 2005).

Dans les vergers la conduite de la liane peut se faire en forme de « T » ou de « pergola ». La forme en « T » est la plus utilisée car elle permet d'améliorer la qualité du kiwi et le rendement en attachant les charpentières et les cannes à une structure en forme de T.

L'obtention d'un fruit de qualité et d'un grand rendement implique qu'un grand nombre de travaux de taille et d'éclaircissage soient effectués tout au long de l'année.

2.3.2. Méthodes de propagation

Les méthodes de propagation les plus utilisées sont le bouturage, soit de baguette, soit par la culture *in vitro*. L'obtention de plants par semis est peu utilisée car il faut attendre l'âge de floraison (3 ans en moyenne) pour différencier les pieds mâles des pieds femelles. Le semis peut néanmoins être utilisé pour obtenir des porte-greffes dont le système racinaire sera bien développé.

Le greffage, très répandu, permet d'obtenir un plant vigoureux qui fructifiera rapidement et aura une meilleure résistance aux conditions climatiques. En France, les cultivars 'Bruno' et 'Abbot' sont souvent utilisés comme porte-greffe.

2.3.3. Optimisation de la pollinisation

Le calibre des fruits dépend de la qualité de la pollinisation des fleurs. Lorsque la production de pollen des pieds mâles n'est pas suffisante ou que les conditions de cultures ne sont pas optimales pour la pollinisation, les producteurs peuvent avoir recours à de la pollinisation artificielle. Il a été démontré que la pollinisation artificielle permet d'augmenter le calibre des fruits, d'autant plus si elle est manuelle plutôt que mécanique (Gonzalez *et al.*, 1998). La pollinisation artificielle, à l'inverse de la Nouvelle-Zélande, est peu pratiquée en France.



Figure 2-6 Photo de chancre sur bois causé par *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidiae* sur *Actinidia*.

Source: <http://www.kvh.org.nz/vdb/document/91544>.

Un autre moyen d'optimiser la pollinisation est de placer des ruches dans les vergers.

2.3.4. Climat et propriétés pédologiques

Le climat idéal pour la culture du kiwi est un climat océanique doux et humide avec des hivers peu rigoureux mais suffisants pour assurer un repos végétatif. La plante peut résister à des températures négatives de l'ordre de -10°C à -30°C , mais les bourgeons sont sensibles au gel printanier. Ce problème peut être contourné par aspersion d'eau sur des parties aériennes.

La culture du kiwi requiert un sol peu profond, fertile, humide, légèrement acide et bien drainé (pour éviter tout risque d'asphyxie racinaire). Il est primordial que la parcelle soit ensoleillée et abritée du vent qui risquerait de freiner la croissance et provoquer des nécroses foliaires (Lespinasse & Leterne, 2005).

2.4. Les agents pathogènes du kiwi

De nombreux agents pathogènes ont été détectés en Chine sur les espèces du genre *Actinidia* (Clover *et al.*, 2003). La Chine ne serait pas seulement le berceau du kiwi mais également celui d'agents pathogènes associés au kiwi.

2.4.1. Bactéries

Les bactéries pathogènes du kiwi appartiennent aux genres *Pectobacterium* et *Pseudomonas*.

Pectobacterium carotovorum subsp. *actinidiae* a été récemment décrit en Corée du sud (Koh *et al.*, 2012a). Cette bactérie, tout comme l'agent responsable du chancre bactérien du kiwi *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*), provoque des chancres sur bois (Figure 2-6). La différence majeure avec *Psa*, c'est que *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidiae* ne cause pas de symptômes sur feuilles.

Parmi le genre *Pseudomonas*, on distingue différents espèces pathogènes du kiwi. *Pseudomonas viridiflava* a été isolé à partir de bourgeons et fleurs de kiwi symptomatiques (nécrose et pourrissement) pour la première fois en Nouvelle-Zélande (Wilkie *et al.*, 1973), puis dans différents pays, dont en France par Luisetti et Gagnard en 1987 (Luisetti & Gagnard, 1987). Des souches identifiées à *Pseudomonas syringae sensu lato* ont été isolées à partir de chancre sur cannes pour la première fois aux Etats-Unis en 1983 par Opgenorth et



Figure 2-7 Photo de symptômes de *Pseudomonas viridiflava* sur *A. chinensis* Planchon.

Symptômes sur bourgeon floral (photo de gauche) et sur fleur (photo de droite) d'*Actinidia*. Sur les deux photos : échantillon sain à droite et infecté à gauche. D'après Wilkie *et al.*, 1973.



Figure 2-8 Photo de galles sur racines d'*Actinidia* causées par *Meloidogyne*.

Photo: Lidia Viterale. Source: <http://agronotizie.imaginenetwork.com/difesa-e-diserbo/2013/03/14/nematodi-dell-actinidia-sintomi-e-danni/17791>;



Figure 2-9 Photos de mouches des fruits présentant un danger potentiel pour la culture du kiwi.

1. *Ceratitis capitata*, 2. *Bactrocera tryoni*, 3. *Bactrocera dorsalis*.

Source: <http://www.kvh.org.nz/vdb/document/91544>.

collègues (Opgenorth *et al.*, 1983), puis dans différents pays dont en France par Luisetti et Gaignard en 1987 (Luisetti & Gaignard, 1987). Ces deux bactéries induisent des symptômes similaires sur bourgeons et fleurs (brunissement, flétrissement, chute de la fleur) (Figure 2-7) et sur bois (flétrissement et chancre). Seules les souches de *Pseudomonas syringae* provoquent des symptômes sur feuilles (taches nécrotiques brunes pouvant être entourées d'un halo chlorotique) (Conn *et al.*, 1993). Les symptômes peuvent parfois conduire à la mort de la plante. Ces bactéries ont été isolées ensemble ou séparément dans un même verger.

Des souches identifiées au pathovar *actinidiae* (*Psa*) au sein de *Pseudomonas syringae sensu lato*, constitue une menace plus sévère pour la culture du kiwi, que celles précédemment mentionnées. Elles constituent l'objet d'étude de ce travail, un état des connaissances de cet agent pathogène constitue la 3^{ème} partie de ce chapitre.

2.4.2. Autres agents pathogènes du kiwi

a. Nématodes

Des nématodes du genre *Meloidogyne* spp. génèrent des galles sur la rhizosphère (Figure 2-8) et impactent ainsi les parties aériennes en diminuant *in fine* la taille des fruits récoltés, et d'une manière générale la plante entière en la rendant très sensible à la sécheresse. Au sein de ce genre on distingue, entre autres, l'espèce *Meloidogyne hapla* reportée pour la première fois sur *A. chinensis* Planchon en France en 1976 par Scotto La Massesse (Scotto La Massese, 1976). Ce nématode a également été recensé en Nouvelle Zélande (Grandison, 1983), en Espagne (Pinochet *et al.*, 1990) et en Italie (Roccuzzo *et al.*, 1993).

b. Insectes

Peu d'insectes sont ravageurs du kiwi. En France, aucun traitement insecticide n'est appliqué sur kiwi. Mais dans le passé quelques traitements hivernaux à base d'huile ont été appliqués dans certains vergers pour lutter contre les cochenilles. Cependant, en Nouvelle-Zélande, une liste d'insectes potentiellement très préjudiciables, et non présents sur le territoire, sont sous surveillance (<http://www.kvh.org.nz/vdb/document/91544>). Trois insectes impliquent des mesures de quarantaine lors de l'import de matériel végétal. La mouche des fruits méditerranéenne ou *Ceratitis capitata*, la mouche des fruits de Queensland ou *Bactrocera tryoni*, et la mouche des fruits orientale ou *Bactrocera dorsalis* (Figure 2-9). Ces mouches pondent leurs œufs dans le fruit, causant d'importantes pertes de récolte. *Drosophila*

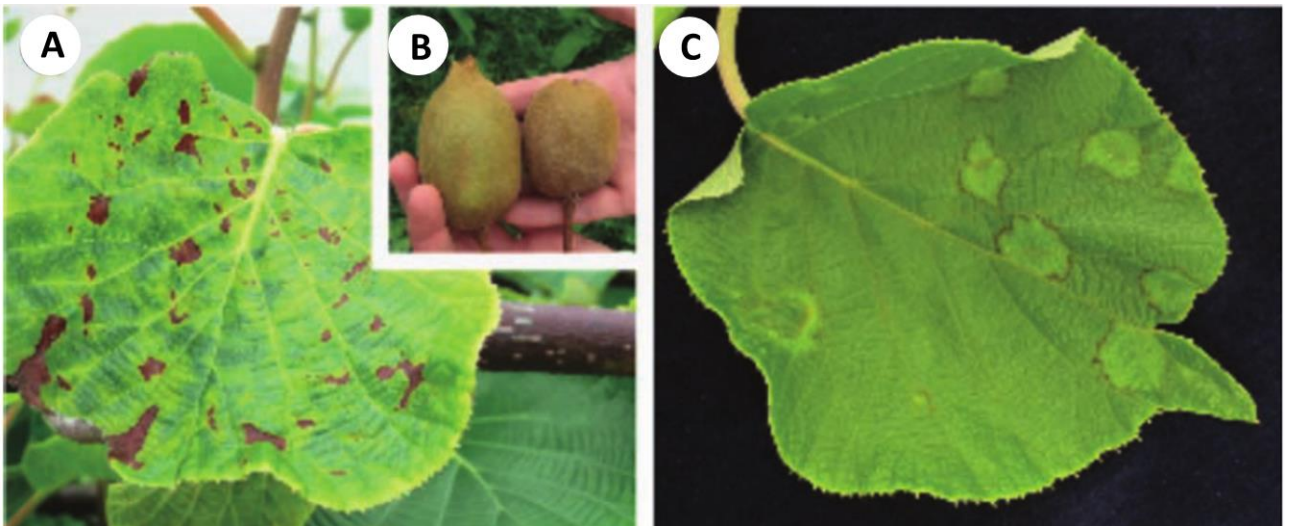


Figure 2-10 Photos de symptômes associés au CLRV et PZSV *A. chinensis* cv. Hort16A.

CLRV : taches nécrotiques sur feuille (A) et sur fruit (B). B : fruit sain à gauche avec un « bec » à l'extrémité du calice (caractéristique de cv. Hort16A) et fruit infecté à droite ne présentant pas de « bec ». PSZV : symptômes sur feuille (C). D'après Blouin *et al.*, 2013.

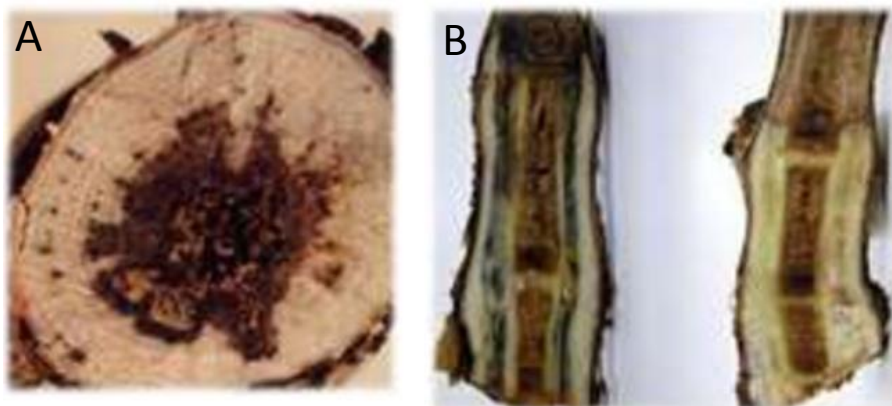


Figure 2-11 Photos de symptômes sur bois dus à *Fomitiporia mediterranea* sur *Actinidia*.

A: coupe transversale de bois présentant un aspect blanchâtre en périphérie et un aspect spongieux brunâtre au centre ; B: coupe longitudinale de bois présentant des zones nécrotiques brunes.

Source: <http://www.kvh.org.nz/vdb/document/91544>

suzukii, une mouche des fruits très polyphage qui envahit les cultures fruitières en France depuis 2010, ne provoque pas de dégâts significatifs sur kiwi.

c. Virus

Parmi les différents virus détectés sur kiwi, deux seulement impactent la production. En Nouvelle-Zélande, le *Cherry Leaf Roll Virus* (CLRV) provoque des symptômes sur feuilles (Figure 2-10), un flétrissement des cannes, une malformation des fruits et une réduction du rendement (Blouin *et al.*, 2013). En Italie, le *Pelargonium Zonate Spot Virus* (PZSV) cause de sévères symptômes sur feuilles et sur fruits (Blouin *et al.*, 2013).

D'autres virus présentent un danger moindre pour la production. Ling et Gao avaient reporté en 1995 des symptômes sur *Actinidia* liés à une infection virale, mais n'avaient pas pu identifier le virus (Lin & Gao, 1995). C'est en 2003 en Nouvelle-Zélande, que Clover et collègues (Clover *et al.*, 2003) l'identifièrent en tant qu'*Apple Stem Grooving Virus* (ASGV) à partir de symptômes sur du bois, importé de Chine et destiné à du greffage. Ce virus impacte légèrement le rendement de la récolte.

d. Champignons

Parmi les champignons pathogènes du kiwi on distingue différentes catégories de par l'organe cible de l'infection et le moment de l'infection. Certains attaquent la rhizosphère, d'autres les parties aériennes, ou bien les fruits après la récolte.

Phytophthora spp induit un pourrissement des racines et du collet qui va impacter les parties aériennes en diminuant la croissance des tiges, en provoquant des chloroses foliaires et une réduction de la surface foliaire. *Phytophthora* peut conduire à la mort de la plante. Sept espèces de *Phytophthora* pathogènes ont été identifiées dans la région d'Auckland, en Nouvelle-Zélande, à partir d'échantillons de sol de 6 vergers (Stewart & McCarrison, 1992).

Fomitiporia mediterranea ou *Fomitiporia punctata* et *Phaeoacremonium parasiticum* induisent un dépérissement et une décoloration du bois, respectivement (Figure 2-11) (Di Marco *et al.*, 2004).

Verticillium albo-atrum (maintenant appelé *Verticillium nonalfalfae*) colonise les vaisseaux du xylème, induit un flétrissement, voire la mort de la plante selon la saison. Au Chili, il a causé une mortalité de 80 % dans des vergers à la fin de l'année de production 2007-2008 (Auger *et al.*, 2009).

Botrytis cinerea est connu pour engendrer des pertes post-récolte (Michailides & Elmer, 2000). Un autre champignon responsable de pertes post-récolte sur kiwi a récemment été identifié en Chine: *Fusarium acuminatum* (Wang *et al.*, 2015).



Figure 3-1 Photo de colonies de *Psa* sur milieu B de King.

Source: LSV Angers.

	Esculine	Fluorescence	Phaséolotoxine	Coronatine	avrD
<i>Psa</i> biovar 1	-	-	+	-	-
<i>Psa</i> biovar 2	-	-	-	+	+
<i>Psa</i> biovar 3	-	-	-	-	+
<i>Psa</i> biovar 4	+	+	-	-	-

Tableau 3-1 Principaux tests biochimiques et moléculaires permettant de distinguer les quatre biovars de *Psa* entre eux.

+: test positif ou présence de gène, - test négatif ou absence de gène.
D'après Vanneste *et al.*, 2013.

3. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, le chancre bactérien du kiwi

3.1. Caractérisation biologique et taxonomie

3.1.1. Caractérisation biologique

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* (*Psa*) est un bacille Gram négatif, mobile avec un à trois flagelles polaires. Les colonies sont rondes, convexes, brillantes, translucides et blanches sur milieu de culture PPGA (Potato Peptone Glucose Agar) (Takikawa *et al.*, 1989) (Figure 3-1).

En 2012, Vanneste et collègues ont révélé que les souches de *Psa* isolées durant les différentes épidémies différaient au niveau biologique et les ont ainsi classées dans quatre biovars (biovar 1 à 4) (Vanneste *et al.*, 2013). Les principales différences qui distinguent les quatre biovars entre eux sont : la production de pigments sur milieu B de King (King *et al.*, 1954), la vitesse de croissance des colonies sur milieu nutritif, la capacité à hydrolyser l'esculine (la réaction d'hydrolyse donne deux produits, du glucose et de l'esculetine qui peut réagir avec des ions FerIII pour donner un précipité noir), la présence ou absence de gènes de toxines (phaséolotoxine et coronatine) et la présence du gène codant pour l'effecteur AvrD (Tableau 3-1). Le gène codant la phaseolotoxine est localisé sur un plasmide spécifique de *Psa* biovar 1 (Marcelletti *et al.*, 2011). Il n'y a pas eu de description de la localisation du gène codant la coronatine pour *Psa* biovar 2. Les colonies de *Psa* biovar 4 poussent plus vite que celles des autres biovars et sont plus muqueuses. Les colonies sont plus grosses (2 à 4 mm pour *Psa* biovar 4 contre 1 à 2 mm pour les autres biovars, après 72h d'incubation à 23-25°C sur milieu NAS (nutrient agar (Oxoid) supplémenté de sucrose (3%)) (Figure 3-2) (Ferrante & Scortichini, 2015).

3.1.2. Taxonomie de *Psa*

Avant de plonger dans le monde des *Pseudomonas syringae*, il convient de rappeler quelques définitions et notions de taxonomie bactérienne.

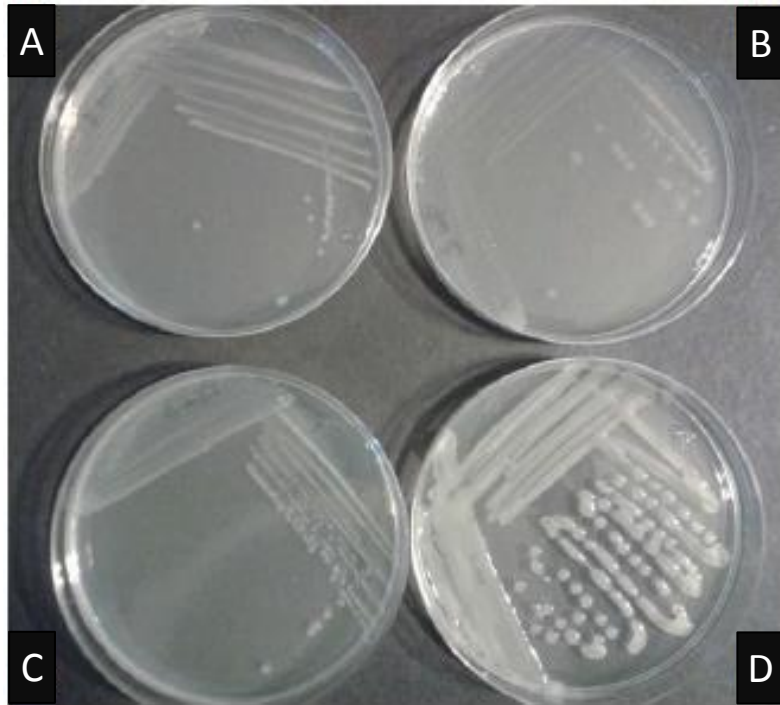


Figure 3-2 Comparaison des morphologies des quatre biovars de *Psa* sur milieu nutritif agar (Oxoid) supplémenté de sucrose (3%) (NAS).

A: *Psa* biovar 1 NCPPB 3739; B: *Psa* biovar 2 KN.2; C: *Psa* biovar 3 CRAFRU 8.43; D: *Psa* biovar 4 ICMP 18802. Observation de la croissance des souches après 72h d'incubation à 23–25°C.

D'après Ferrante & Scortichini, 2015.

a. Concept de l'espèce bactérienne

Le concept biologique des espèces, défini par Ernst Mayr en 1942, est le suivant « une espèce est un groupe de populations naturelles au sein duquel les individus peuvent, réellement ou potentiellement, échanger du matériel génétique ; toute espèce est séparée des autres par des mécanismes d'isolement reproductif » (Mayr, 1942). Les bactéries se reproduisant de manière asexuée (multiplication clonale) et ayant la capacité à échanger du matériel génétique par transfert horizontal avec des souches d'espèces différentes, il est difficile d'appliquer pleinement ce concept biologique des espèces aux procaryotes.

En 1973, Johnson (Johnson, 1973) proposa une nouvelle méthode, en complément de l'analyse des caractéristiques phénotypiques (Wayne *et al.*, 1987), rentrant dans le cadre de la définition d'une espèce bactérienne : l'hybridation ADN-ADN (HDD). Il mit en évidence qu'un pourcentage d'hybridation relatif supérieur ou égal à 70 % ainsi qu'un ΔT_m inférieur ou égal à 5°C entre deux génomes bactériens permet de les classer génétiquement au sein d'une même espèce génomique ou « genomospecies ». Selon Wayne et collègues (Wayne *et al.*, 1987), il est indispensable de coupler l'HDD à des analyses phénotypiques pour identifier une espèce, l'HDD seule n'étant pas suffisant, ce qui fut approuvé par Stackebrandt et collègues (Stackebrandt *et al.*, 2002).

b. Sous-division de l'espèce ou sous-espèce

On parle de sous-division (« subdivision ») et non de division afin d'éviter toute confusion avec la catégorie taxonomique « division » (Lapage *et al.*, 1992). Un taxon infra-spécifique (« infraspecific ») correspond à une souche ou un groupe de souches de la même espèce (ou sous-espèce) présentant les mêmes propriétés, ou des propriétés similaires, et qui sont assimilées à un groupe taxonomique.

Le suffixe « -var » ou « -form » est utilisé à la place de « -type » afin d'éviter toute confusion avec le terme « type » qui a une signification en terme de nomenclature. Les différents termes utilisés sont les suivants : biovar, chemoform, chemovar, cultivar, *forma specialis*, morphovar, pathovar, phagovar, phase, serovar et « state » (Lapage *et al.*, 1992). Voici la définition de deux termes qui vont être repris dans les travaux de thèse :

❖ Pathovar

Le terme « pathovar » fait référence à un ensemble de souches présentant des caractéristiques similaires ou identiques et qui sont différenciées au niveau infra-spécifique

des autres souches de la même espèce ou sous-espèce sur la base de leur pathogénie envers une ou plusieurs plantes hôtes (Dye, 1980) (http://www.isppweb.org/about_tppb_naming.asp). La nomenclature des pathovars est régie par les Standards (Dye, 1980).

❖ *Biovar*

Un biovar regroupe des souches présentant les mêmes caractéristiques biochimiques ou physiologiques (Lapage *et al.*, 1992). Le biovar n'est pas un rang taxonomique régit par le Code de la nomenclature (Lapage *et al.*, 1992).

❖ *Souche Type, souche Pathotype*

La souche type d'une espèce, ou d'une sous-espèce, est celle dont le nom y est toujours associé. La souche pathotype représente la souche à partir de laquelle se basent la description et le nom du pathovar, et avec laquelle le nom du pathovar est associé de façon permanente (Dye, 1980).

3.1.3. **Histoire de la taxonomie des *Pseudomonas syringae***

Le genre *Pseudomonas* a été proposé pour la première fois par Migula en 1984. Il incluait toutes les bactéries décrites comme telles : bacilles Gram-négatifs, mobiles avec un ou plusieurs flagelles, aérobies à métabolisme strictement respiratoire, et chimioorganotrophes (Young, 2010). Le genre *Pseudomonas* appartient à la famille des *Pseudomonadaceae*, à l'ordre des *Pseudomonadales*, à la classe des γ -*proteobacteria*, à la division des *Proteobacteria* et au règne des *Bacteria*.

Pseudomonas syringae (*P. syringae*) a été isolée pour la première fois par Van Hall en 1902 sur un Lilas malade (*Syringa vulgaris*), d'où le nom de l'espèce « *syringae* ». Durant les décades qui suivirent, des souches phytopathogènes présentant des caractéristiques générales similaires à *P. syringae* furent isolées à partir de symptômes sur de nombreuses espèces de plantes. Ces souches avaient en commun de produire un pigment fluorescent sur un milieu carencé en Fer : le milieu B de King (King *et al.*, 1954). Ce pigment est un sidérophore de type pyoverdine qui joue un rôle dans l'interaction plante-bactérie au niveau de l'apoplaste, principal lieu de multiplication de *P. syringae* au cours de l'infection de la plante. Ces souches diffèrent entre elles au niveau de leur gamme de plantes hôtes, du type de symptômes et de leurs caractéristiques phénotypiques. Les premières classifications étaient basées sur la

pathogénie au sein des *Pseudomonas* fluorescents isolés des parties aériennes des plantes. Un nom d'espèce était assigné aux souches isolées d'un symptôme sur une plante donnée, jusqu'en 1980. On nomma ainsi *P. tomato*, les souches isolées de tomate, *P. phaseolicola* les souches isolées de taches graisseuses sur haricot, *P. lachrymans*, les souches isolées de « larmes » de concombre, etc.

Lelliott et collègues (Lelliott *et al.*, 1966) mirent au point une batterie de tests biochimiques, qui permirent d'aider à l'identification de ces *Pseudomonas* fluorescents, basée sur 5 tests majeurs: production de levane (Levan), activité oxydase (Oxidase), capacité à dégrader les pommes de terre (Potato rot), production d'arginine dihydrolase (Arginin dihydrolase) et réaction hypersensible sur tabac (Tobacco). Lelliott fut le précurseur du « complexe *P. syringae* » (Young, 2010). Sand et collègues (Sands *et al.*, 1970) montrèrent que les espèces du groupe 1 défini par le schéma du LOPAT de Lelliott et collègues (Lelliott *et al.*, 1966), qui contient les *Pseudomonas fluorescents* phytopathogènes, avaient des profils phénotypiques homogènes et que les populations pathogènes ne pouvaient pas être différenciées par des caractères biochimiques ou nutritionnels. Les travaux de Palleroni et collègues sur la taxonomie bactérienne, utilisant des approches basées sur la comparaison des acides nucléiques, ont permis de progresser dans la compréhension de la structure des *Pseudomonas* (Palleroni *et al.*, 1973). Ils utilisèrent l'hybridation de l'ADN avec des sondes d'ARN ribosomique pour mesurer la similitude entre les *Pseudomonas*. Ils groupèrent par cette méthode les *Pseudomonas* fluorescents pathogènes des plantes dans un même groupe taxonomique. Quarante espèces bien connues pour leur pathogénie ont été amalgamées dans une espèce *Pseudomonas syringae sensu lato*. Dye et collègues (Dye, 1980) proposèrent une nomenclature utile aux pathologistes pour désigner les ensembles de souches au sein de cette espèce *Pseudomonas syringae sensu lato* qui étaient caractérisés par un spectre d'hôte étroit, le plus souvent associés à une seule espèce végétale. Le concept de « pathovar » était né. Ce terme est un élément de nomenclature, il ne correspond pas à un terme taxonomique inféodé au Code international et il est régi par une norme (« standards » en anglais). La logique fut acceptée et un comité au sein de l' « International Society of Plant Pathology » (ISPP) fut créé pour gérer cette norme, et notamment la nomination de nouveaux pathovars lorsque c'est nécessaire.

L'espèce *P. syringae* a été identifiée sur 400 espèces végétales, illustrant bien son large spectre d'hôtes (Bradbury, 1986). *P. syringae* pv. *syringae* est un cas à part. On le retrouve sur une large gamme d'hôtes qui va des arbres fruitiers (cerisier, prunier, abricotier, pêcher), à

Rang taxonomique	Caractères phénotypiques	ADNr 16S	HDD	Analyses multilocus	Analyse génome
Famille	+	+	-	+	+
Genre	+	±	±	+	+
Espèce	+	-	+	+	+
Sous-espèce	±	-	-	+	+

Tableau 3-2 Niveaux de résolution des techniques utilisées en taxonomie bactérienne.

HDD: hybridation ADN/ADN.

D'après Staley, 2006.

la plante, aux citrus et en passant par des plantes potagères (haricot, poivron) ou ornementales (Hibiscus, Lilas) (Lepoivre, 2003, Bradbury, 1986). Mais généralement les pathovars ne sont pathogènes qu'envers une seule espèce végétale hôte. Par exemple, *P. syringae* pv. *pisi* sur le pois, *P. syringae* pv. *phaseolicola* sur haricot, *P. syringae* pv. *glycinea* sur soja ou *P. syringae* pv. *persicae* sur pêcher (Bradbury, 1986).

Pour en revenir à la taxonomie, les avancées technologiques, dont l'accessibilité au séquençage de l'ADN, ont permis d'affiner la taxonomie des *Pseudomonas* au niveau infra-spécifique par une approche polyphasique. Une approche polyphasique en taxonomie peut se définir par l'utilisation des données phénotypiques et génotypiques disponibles, et qui conduisent à une classification présentant le minimum de contradictions (Gevers *et al.*, 2005). Parmi ces nouvelles techniques on distingue : l'HDD (Johnson, 1973), les méthodes rep-PCR ciblant des éléments répétés REP (Repetitive Extragenic Palindromic) du génome (Versalovic *et al.*, 1991), le séquençage de gènes conservés tels que le l'ADN ribosomal 16S (ADNr 16S) (Woese, 1987) ou les gènes de ménage (housekeeping genes) dans le cadre d'analyses multilocus (Gevers *et al.*, 2005, Maiden *et al.*, 1998) et le séquençage du génome entier à partir duquel il est possible de calculer une moyenne d'identité nucléique ou ANI (Average of Nucleic Identity) (Konstantinidis & Tiedje, 2005). Les niveaux de résolution des différentes approches utilisées en taxonomie bactérienne sont présentés dans le tableau 3-2.

En 1999, Gardan et collègues (Gardan *et al.*, 1999) ont mis en évidence 9 genomospecies au sein des *Pseudomonas* phytopathogènes fluorescents à partir d'une analyse HDD. Cette classification fut ensuite affinée par Sarkar et Guttman (Sarkar & Guttman, 2004) et Hwang et collègues (Hwang *et al.*, 2005) avec une approche phénotypique combinée à une approche génétique par typage MLST (de séquence multilocus) couplant l'analyse de gènes du core genome (incluant les gènes de ménage et les ARNs) et de gènes du génome accessoire (incluant les gènes d'effecteurs) (Sarkar *et al.*, 2006). Ils révélèrent une base phylogénétique robuste pour des analyses de l'adaptation à l'hôte et de la pathogénie de *P. syringae*, et identifièrent 7 phylogroupes. Bull et collègues (Bull *et al.*, 2011) confirmèrent par une approche MLST que 8 sur les 9 genomospecies (le genomospecies 5 a été éliminé car la souche *P. syringae* pv. *tremae* a été réassignée au genomospecies 2), définis par Gardan et collègues (Gardan *et al.*, 1999), constituaient bien des groupes phylogénétiques discrets et relatèrent la présence d'environ 60 pathovars au sein du complexe *P. syringae sensu lato*. Très récemment, Berge et collègues (Berge *et al.*, 2014) affinèrent la phylogénie de *P.*

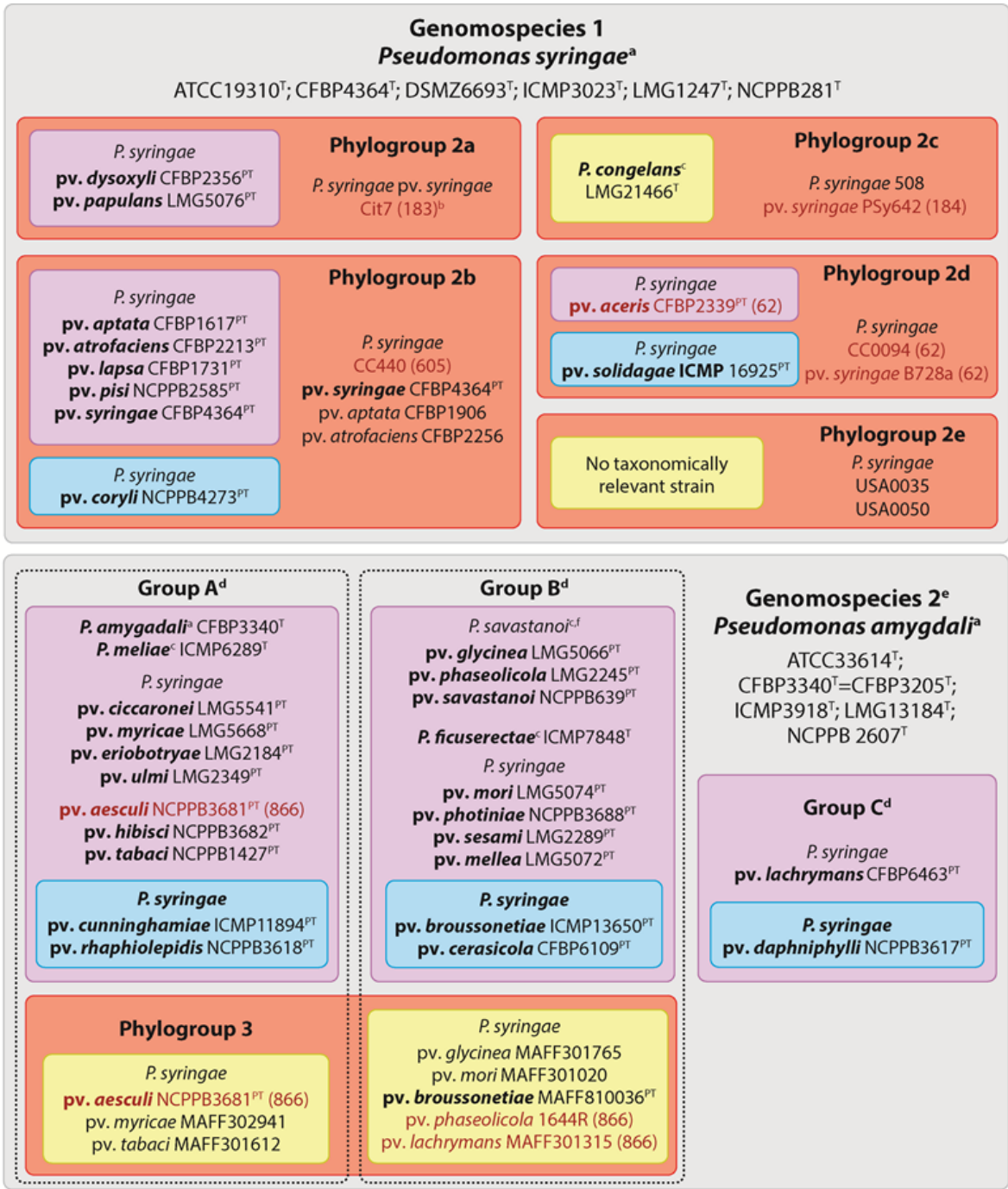


Figure 3-3 Espèces et pathovars au sein de *P. syringae* sensu lato distingués au sein de phylogroupes ou genomospecies.

T : souche type ; PT : souche pathotype .

D'après Bull & Koike, 2015.

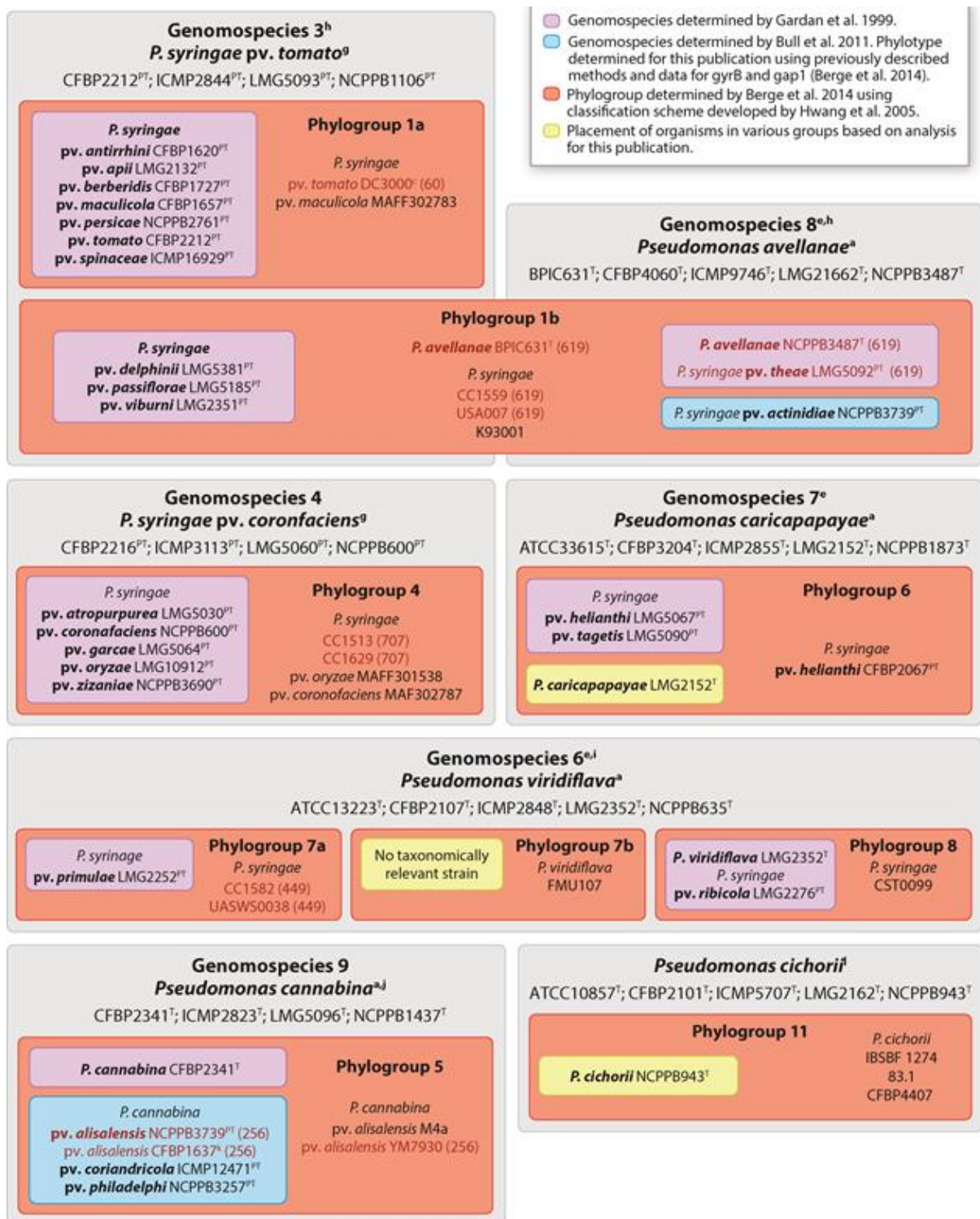


Figure 3-3 (suite) Espèces et pathovars au sein de *P. syringae* sensu lato distingués au sein de phylogroupes ou genomospecies.

T : souche type ; PT : souche pathotype .

D'après Bull & Koike, 2015.

syringae par une approche Multilocus Sequence Analysis (MLSA) en décrivant plus de phylogroupes que ceux décrits jusqu'à présent, 13 phylogroupes au total. Ils incluent dans leur collection de travail des souches non pathogènes isolées de l'environnement.

Le schéma publié cette année par Bull et Koike (Bull & Koike, 2015), résume bien les relations entre les différents genomospecies, phylogroupes, espèces et pathovars définis durant ces vingt dernières années (Figure 3-3).

Lorsque l'on fait le bilan sur l'histoire de la taxonomie des *P. syringae*, nous pouvons mettre en évidence des failles. Certaines souches similaires ont été assignées à des noms de pathovars différents et la définition de pathovar, relatif au pouvoir pathogène d'une souche envers un hôte ou une gamme d'hôte, ne peut être appliquée pour des souches non pathogènes. Mais ce qui est primordial c'est de conserver une uniformité dans la classification, l'identification et la dénomination des espèces, sous-espèces et pathovars. Les Standards et le Code de la nomenclature permettent d'assurer cette uniformité (Dye, 1980, Lapage *et al.*, 1992).

3.1.4. Positionnement de *Psa* au sein de la taxonomie des *P. syringae*

La première étude de phylogénie centrée sur *Psa* a été menée avec les séquences partielles de sept gènes de ménages codant pour aconitate hydratase B, *acn* ; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *gapA* ; citrate synthase, *gltA* (ou *cts*) ; DNA gyrase B, *gyrB* ; phosphofructokinase, *pfk* ; phosphoglucosomerase, *pgi* ; et sigma factor 70, *rpoD* (Chapman *et al.*, 2012). L'arbre phylogénétique, construit avec les résultats du génotypage des sept gènes de ménages avec des souches de *Psa* biovars 1 à 4 et d'autres souches de *P. syringae sensu lato*, révèle que chaque biovar se retrouve dans un cluster phylogénétique distinct (Figure 3-4 A).

Le pathovar *actinidiae* est inclus dans le genomospecies 8 défini et le phylogroupe 1b (Bull *et al.*, 2011, Berge *et al.*, 2014) (Figure 3-4-B). Les biovars 1, 2 et 3 sont génétiquement étroitement liés et plus proches de *P. syringae* pv. *theae* que de *Psa* biovar 4

D'autres analyses de phylogénie ont ensuite été réalisées sur une collection de souches plus grande et d'origines plus diverses, soit à partir des séquences de gènes de ménages, soit des séquences entières de génomes (Marcelletti *et al.*, 2011, Mazzaglia *et al.*, 2012, Butler *et al.*, 2013, McCann *et al.*, 2013). Butler et collègues ont mis en évidence de la variabilité au sein de souches de *Psa* biovar 4 isolées en Nouvelle-Zélande, en distinguant deux lignées phylogénétiques : PsHa (pour *P. syringae* 'Hayward', le cultivar le plus commun d'*A.*

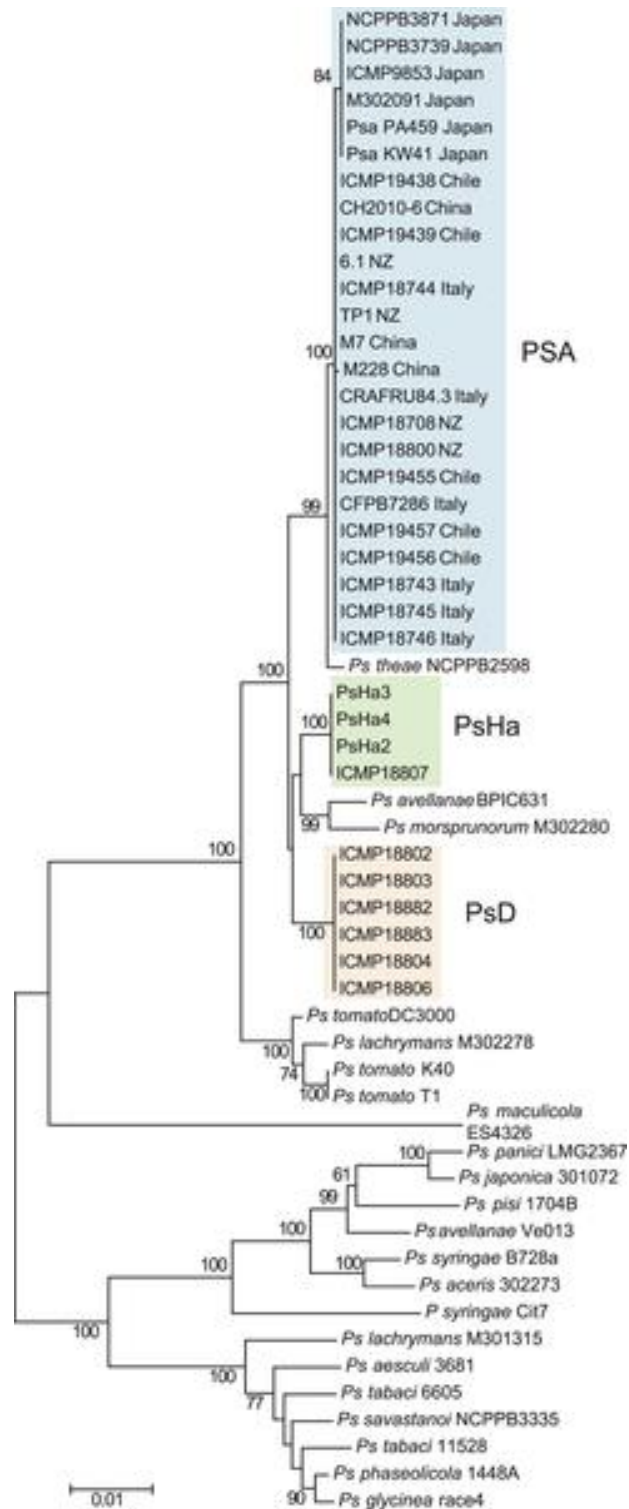


Figure 3-5 Arbre phylogénétique construit en Neighbour Joining avec la concaténation des séquences de quatre gènes de ménage (*gapA*, *gltA*, *gyrB*, et *rpoD*).

Les valeurs de bootstrap (de 0 à 100) sont indiquées à chaque nœud. En bleu: les souches de *Psa* biovar 1, 2 et 3; en vert: les souches de *Psa* biovar 4 nommées PsHa; en orange: les souches de *Psa* biovar 4 nommées PsD.

D'après Butler *et al.*, 2013.

deliciosa) et PsD (pour *P. syringae Deliciosa*) (Figure 3-5) (ces noms ayant été données à titre informel et non en tant que noms de nouveaux pathovars) (Butler *et al.*, 2013).

3.2. Symptômes, gamme d'hôtes, cycle de la maladie et voies de dissémination

3.2.1. Symptômes et gamme d'hôtes

a. Généralités sur les symptômes provoqués par les *P. syringae*

De façon générale, *P. syringae* cause des symptômes sur les parties aériennes des plantes : feuilles, tiges, branches, fruits,... (Figure 3-6).

Les symptômes peuvent affaiblir les arbres, diminuer le calibre des fruits, affecter le rendement de manière directe (chute des fleurs ou des fruits en formation) mais peuvent aussi parfois conduire à la mort de la plante ou des arbres.

Au début de l'infection on observe un phénomène de « water soaking ». Les tissus infectés se gorgent d'eau, prennent un aspect huileux à la limite de la lésion et finissent par brunir (Gaignard & Luisetti, 1993). Ce symptôme typique est dû au transfert du liquide cytoplasmique des cellules végétales vers l'apoplaste, lieu de multiplication des bactéries au cours de l'infection. A ce stade de l'infection il est difficile de déterminer l'agent pathogène responsable et seul un isolement permet de le caractériser.

Etant un agent de type nécrogène, *P. syringae* provoque une destruction plus ou moins localisée des tissus parenchymateux. Sur feuille, les nécroses peuvent parfois être entourées d'un halo chlorotique pouvant évoluer en criblure. Ce halo chlorotique est souvent dû à l'action de toxines, telles que la phaséolotoxine (*P. s. pv. phaseolicola*, *Psa*) la coronatine (*P.s. pv. tomato*, *P.s. pv. glycinea*, *Psa*), la syringomycine (*Pss*) et la syringotoxine (*P. s. pv. syringae*). Les nécroses peuvent être observées sur d'autres organes, tels que les bourgeons floraux, les fleurs, les fruits ou le bois, dans le cas de *P. syringae pv. syringae*, *P. viridiflava* ou *P. syringae pv. morsprunorum* sur les arbres fruitiers à noyau (Gaignard & Luisetti, 1993, Luisetti & Gaignard, 1987, Cazorla *et al.*, 2007). Des galles peuvent également être observées sur bois, comme sur olivier avec *P. savastanoi pv. savastanoi*, (Cazorla *et al.*, 2007, Opgenorth *et al.*, 1983). La présence de chancre est un symptôme caractéristique des pathovars de *P. syringae*. Il peut être accompagné d'exsudat dans le cas de *Psa* sur kiwi ou de gommose comme c'est le cas pour le cerisier infecté par *P. syringae pv. morsprunorum* (Cazorla *et al.*, 2007) ou pour le manguier infecté par *P. syringae pv. syringae* (Aiello *et al.*,

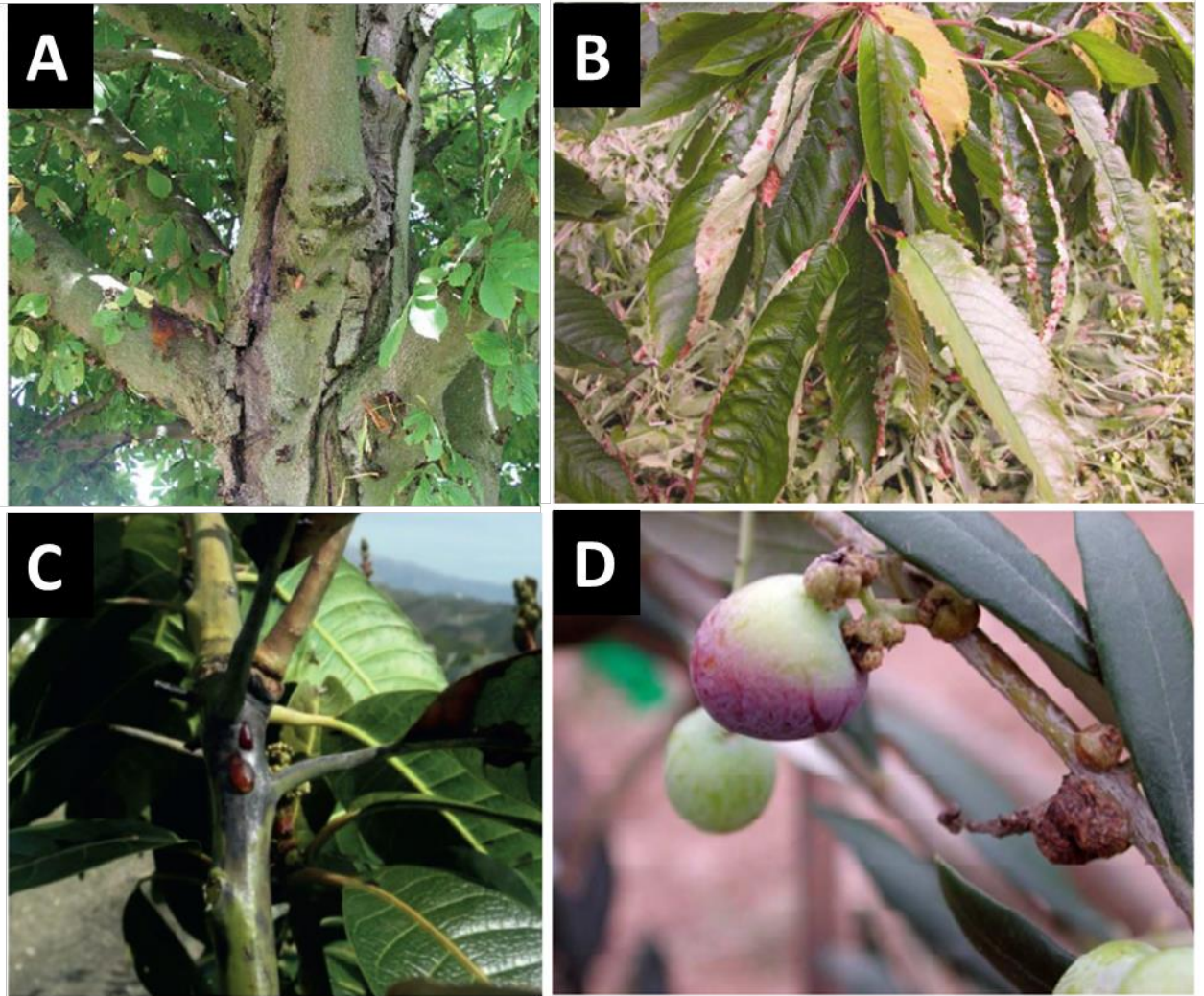


Figure 3-6 Photos de symptômes causés par des *P. syringae*.

A : chancre suintant sur marronnier infecté par *P. syringae* pv. *aesculi* (Green et al., 2010); B : tâches nécrotiques sur feuilles de cerisier infecté par *P. syringae* pv. *syringae*

(http://msue.anr.msu.edu/news/managing_bacterial_canker_in_sweet_cherries_what_are_the_options); C : nécroses et exsudats sur branche de manguier infecté par *P. syringae* pv. *syringae* (Aiello et al., 2015); D : galles sur olivier infecté par *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Quesada et al., 2012).

2015). On peut même observer des déformations du fruit, comme par exemple sur pêcher lors d'une infection due à *P. syringae* pv. *persicae* (Gaignard & Luisetti, 1993).

Il a été montré que *P. syringae* a la capacité à pénétrer dans les vaisseaux du bois (xylème) et circuler de façon systémique des parties infectées vers des parties saines (branches voire les racines), comme dans le cas, par exemple, de *P. avellanae* (Green *et al.*, 2010).

b. Symptômes caractéristiques de Psa

Psa biovars 1, 2 et 3 provoquent des symptômes sur feuilles et sur bois, à l'inverse de *Psa* biovar 4 qui ne provoque que des symptômes sur feuilles. De ce fait, les symptômes décrits sur d'autres organes que les feuilles ne concernant que les biovars 1, 2 et 3.

Sur feuille on observe des taches nécrotiques anguleuses marron foncé à noir, parfois entourées d'un halo chlorotique, identiques pour les quatre biovars (Figure 3-7 A). *Psa* est responsable de la fanaison, du brunissement des bourgeons floraux et des fleurs (Figure 3-7 B), ainsi que du flétrissement des fruits, ce qui peut engendrer la chute des fleurs et des fruits. Sur cannes on peut observer des exsudats blancs ou rouges (Figure 3-7 C). La bactérie cause des chancres sur bois (Figure 3-7 D) avec un brunissement et une décoloration sous l'écorce (Figure 3-7 E). On peut remarquer la nécrose et le flétrissement des cannes qui peuvent parfois se propager à toute la plante (Figure 3-7 F) et conduire à la mort de celle-ci.

c. Gamme d'hôtes de Psa

La gamme d'hôtes de *Psa* est restreinte au genre *Actinidia*. A ce jour *Psa* a été isolé sur *A. chinensis*, *A. deliciosa*, *A. kolokmita* et *A. arguta* (Serizawa *et al.*, 1989, Scortichini, 1994, Vanneste *et al.*, 2014, Ushiyama *et al.*, 1992b). Le pouvoir pathogène de *Psa* a été testé par piqûre sur la tige d'autres plantes et arbres fruitiers (une goutte d'inoculum à 10^9 CFU/mL déposé sur le point de piqûre) (Takikawa *et al.*, 1989). Seuls des symptômes, de type HR (réaction d'hypersensibilité), furent observés sur le pêcher (*Prunus persica*) et l'abricotier japonais (*Prunus mume*). Aucun symptôme assimilable à un chancre, comme peuvent causer *P. syringae* pv. *syringae* ou *P. morsprunorum* sur ces arbres, ne fut détecté.

**A**

Photo: SRAL Rhones Alpes

**B**

Photo LSV 2012 - Landes

**C**Photo: Everett *et al.* 2011**D**

Photo LSV 2012 Landes

**E**

Photo LSV 2012 Landes

**F**

Photo Zespri 2012 - Rhones Alpes

Figure 3-7 Photos des différents symptômes causés par *Psa* sur *Actinidia*. A: tâches nécrotiques anguleuses entourées d'un halo chlorotique (SRAL Rhône-Alpes); B: exsudat sur canne (LSV); C: brunissement des fleurs (Everett *et al.*, 2011); D: chancre sur bois (LSV); E: brunissement et décoloration sous l'écorce (LSV); F: flétrissement des charpentières (SRAL Rhône-Alpes).

3.2.2. Cycle de la maladie

a. Généralités sur les phases épiphyte et pathogènes chez les *P. syringae*

❖ La phase épiphyte

La phyllosphère fut définie par Last en 1954 et par Runen en 1955 comme étant, par analogie à la rhizosphère, la sphère supérieure de la plante (majoritairement constituée de feuilles) et reconnue en tant qu'habitat pour les micro-organismes (Last, 1955, Ruinen, 1956). Hirano et Upper proposèrent en 1983 une définition de la bactérie épiphyte : « les bactéries épiphytes sont celles qui peuvent être décrochées des parties aériennes de la plante par lavages » (Hirano & Upper, 1983). Cette définition ne permet pas de différencier et de quantifier toutes les bactéries dites « résidentes » de celles dites « fortuites », mais permet d'avoir un rapide aperçu et une estimation de la taille des populations bactériennes présentes. Une bactérie épiphyte est donc une bactérie capable de coloniser la phyllosphère, de s'y installer et de se multiplier de manière importante sans provoquer de symptôme de maladie apparent.

Dans le cadre des bactéries pathogènes se trouvant sur une plante hôte, le stade épiphyte précède celui de la maladie. C'est durant la phase épiphyte que la bactérie va accroître sa population afin de former l'inoculum de départ pour infecter la plante. La taille de la population est liée à la probabilité du développement de la maladie, si la population ne croît pas, il n'y aura pas de maladie (Rouse *et al.*, 1985). Crosse fut le premier en 1959 à relier la présence de *P. syringae* pv. *morsprunorum* sur des feuilles saines de cerisier à l'inoculum de départ de l'infection des tiges et des branches (Crosse, 1959). La source primaire d'inoculum n'était ainsi plus restreinte aux lésions, comme c'était le cas jusque-là, mais se trouvait en amont de l'apparition des symptômes. Les travaux de Leben en 1965 sur *P. syringae* et *Xanthomonas campestris* allèrent dans le sens de ce nouveau concept, certaines bactéries phytopathogènes sont capables d'avoir une croissance épiphyte sur des feuilles saines de leur plante hôte et ces bactéries pathogènes ont aussi bien une phase de croissance épiphyte que pathogène (Leben, 1965). Le cycle biologique de *P. syringae* dans la phyllosphère a alors été étendu de la phase pathogène à la phase épiphyte (Hirano & Upper, 2000).

Différents facteurs biologiques (génotype de la plante hôte, stade phénotypique des feuilles), chimiques (composition des nutriments : sucres, acides aminés,...), environnementaux (pluie, température, humidité relative, UV, ...) et l'accessibilité aux nutriments (épaisseur de la cuticule) vont conditionner la survie et la multiplication de la

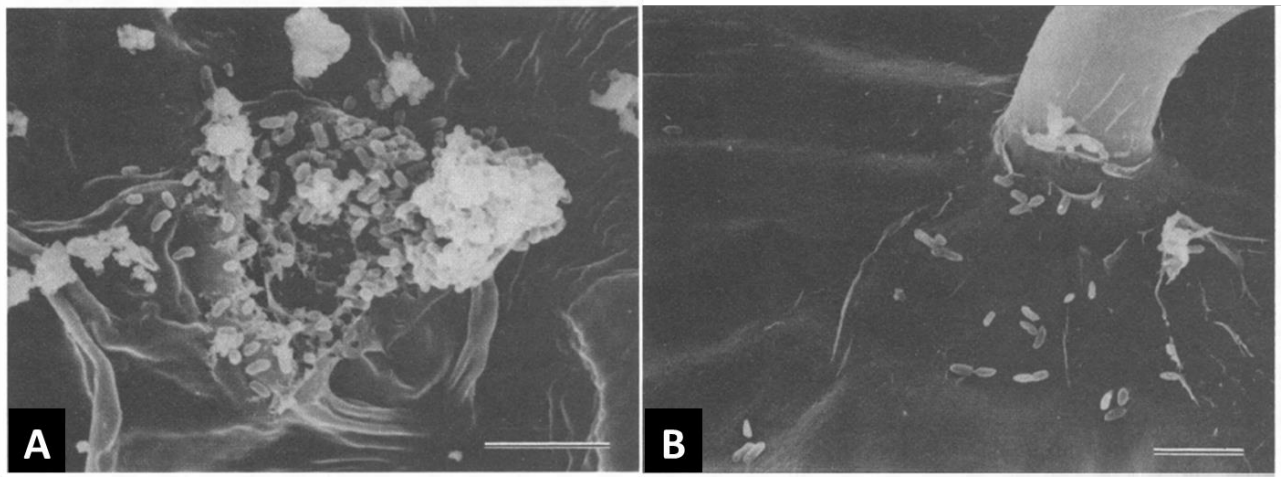


Figure 3-8 Observation au microscope électronique à balayage de feuilles de pommier 6 jours après inoculation avec une souche pathogène de *P. syringae* pv. *syringae*.

A : des populations de bactéries sont regroupées autour d'un stomate ; B : cellules bactériennes isolées à la base d'un trichome. Echelle à 5 μ m.

D'après Mansvelt & Hatting, 1989.

bactérie (Hirano & Upper, 2000). La pluie est un facteur favorisant la multiplication de la bactérie. Par exemple, dans le cas de *P. syringae* pv. *syringae* sur haricot un épisode de pluie allant de 1 à 5 jours engendre une augmentation de la taille de la population bactérienne de 10 à 1 000 fois (Hirano *et al.*, 1996). L'augmentation de la taille des populations en période humide, en comparaison avec une période sèche, a également été démontrée par Hirano et Upper (Hirano & Upper, 1990). La production de pigments permet aux bactéries de se protéger contre les UV, la formation de biofilms favorise la colonisation de la phyllosphère qui peut être un environnement hostile, et la production d'exopolysaccharides (EPS) évite le stress hydrique et le stress oxydatif (en lien avec les espèces réactives d'oxygènes produites par la plante) (Lindow & Brandl, 2003).

La mobilité flagellaire confère aux *P. syringae* un avantage de fitness au stade épiphyte. Haefele et Lindow ont mis en évidence que la perte de mobilité flagellaire d'une souche de *P. syringae* réduit d'un tiers sa fitness épiphyte en terme de croissance, de survie et de compétitivité envers la communauté bactérienne se trouvant sur feuille de haricot (Haefele & Lindow, 1987). La capacité d'adhésion est aussi un trait important de la fitness de *P. syringae* (Hirano & Upper, 2000).

❖ *La phase pathogène*

Le passage de la phase épiphyte à la phase pathogène se fait lorsque la bactérie a atteint une taille de population élevée et qu'elle arrive à pénétrer dans les espaces intercellulaires de l'épiderme de la feuille. Plusieurs manières et voies d'entrées sont possibles pour la bactérie. On distingue les voies d'entrées naturelles (stomates, trichomes) (Figure 3-8), les lésions naturelles (plaies pétiolaires ou pédonculaires, par exemple), les blessures (intempéries telles que le vent, la pluie, la grêle, le gel ; les pratiques culturales telles que la taille ; insectes ou animaux) et les lésions résultantes de bactéries ayant un pouvoir glaçogène (voir partie 3.3.3.b) (Gaignard & Luisetti, 1993).

Melotto et collègues ont mis en évidence que la production de toxine, telle que la coronatine (voir partie sur les toxines 3.3.3.a), par des souches de *P. syringae* induit la réouverture des stomates, qui s'étaient fermés suite à la reconnaissance par la plante de la présence de la bactérie en guise de protection (Melotto *et al.*, 2006). La création de mutant de délétion pour la production de coronatine a confirmé qu'en absence de toxine, les souches ne pouvaient plus induire l'ouverture des stomates.

Certaines bactéries produisent des enzymes extracellulaires qui vont leur permettre de dégrader la cutine (cutinases) ou des constituants de la paroi cellulaire végétale, telle que la



Figure 3-9 Schéma du cycle de la maladie du chancre bactérien du kiwi due à *Psa*.

Hiver: formation de chancre sur bois, apparition d'exsudats et dispersion massive de la bactérie; Printemps: migration systémique de la bactérie, flétrissement des pousses, des bourgeons et des canes, tâches nécrotiques sur feuilles et nécrose des fleurs; Été: phase de latence, formation de chancres sur les charpentières et le tronc; Automne: dissémination de la bactérie, colonisation des lenticelles et des pédoncules.

D'après Scortichini *et al.*, 2012.

pectine par exemple (pectinases). L'action de ces enzymes va permettre aux bactéries d'assimiler ces substrats, mais également d'accéder au contenu intracellulaire. Liao et Wells ont mis en évidence la production de pectinases et de cellulases chez des souches des *Pseudomonas* étroitement liées à *P. viridiflava* (Liao & Wells, 1987).

b. Cycle de la maladie sur kiwi due à Psa

Comme tous les *P. syringae*, *Psa* a une vie épiphyte (Vanneste *et al.*, 2011c). Mais à ce jour, très peu de travaux ont été conduits sur ce sujet. La phase pathogène a été étudiée au travers de nombreux travaux et Scortichini et collègues ont proposé un schéma représentatif du cycle de la maladie (Figure 3-9) (Scortichini *et al.*, 2012).

Durant l'hiver on observe la formation de chancre sur bois et l'apparition d'exsudats (pouvant être assimilés à de l'inoculum « pur, 100% *Psa* ») qui vont être une source de dispersion massive de la bactérie. Le froid favorise la colonisation de la plante, notamment le gel qui crée des portes d'entrée pour la bactérie et affaiblit la plante qui devient alors plus sensible à la maladie (Ferrante & Scortichini, 2014).

Puis au printemps ce sont les organes en croissance qui sont la cible de la bactérie qui migre de façon systémique *via* le xylème. On remarque un flétrissement des jeunes pousses, des bourgeons et des cannes ou sarments de l'année précédente, des tâches nécrotiques sur feuilles et des nécroses sur fleurs. Un printemps humide va favoriser la multiplication de la bactérie et les symptômes observés n'en seront que plus sévères.

En été la multiplication de la bactérie est freinée par les températures élevées, à partir de 25 °C. On remarque néanmoins la formation de chancres sur les charpentières et le tronc, et la colonisation des stomates (Spinelli *et al.*, 2011). Nous avons remarqué, au Laboratoire de la Santé des Végétaux, qu'à cette période il est très rare, voire impossible, d'isoler la bactérie à partir de symptômes sur feuilles. Il est possible que la bactérie colonise d'autres organes que les feuilles en été.

Enfin, en automne les températures et l'humidité redeviennent favorables à la multiplication, la colonisation des lenticelles et des pédoncules, et à la dissémination de la bactérie.

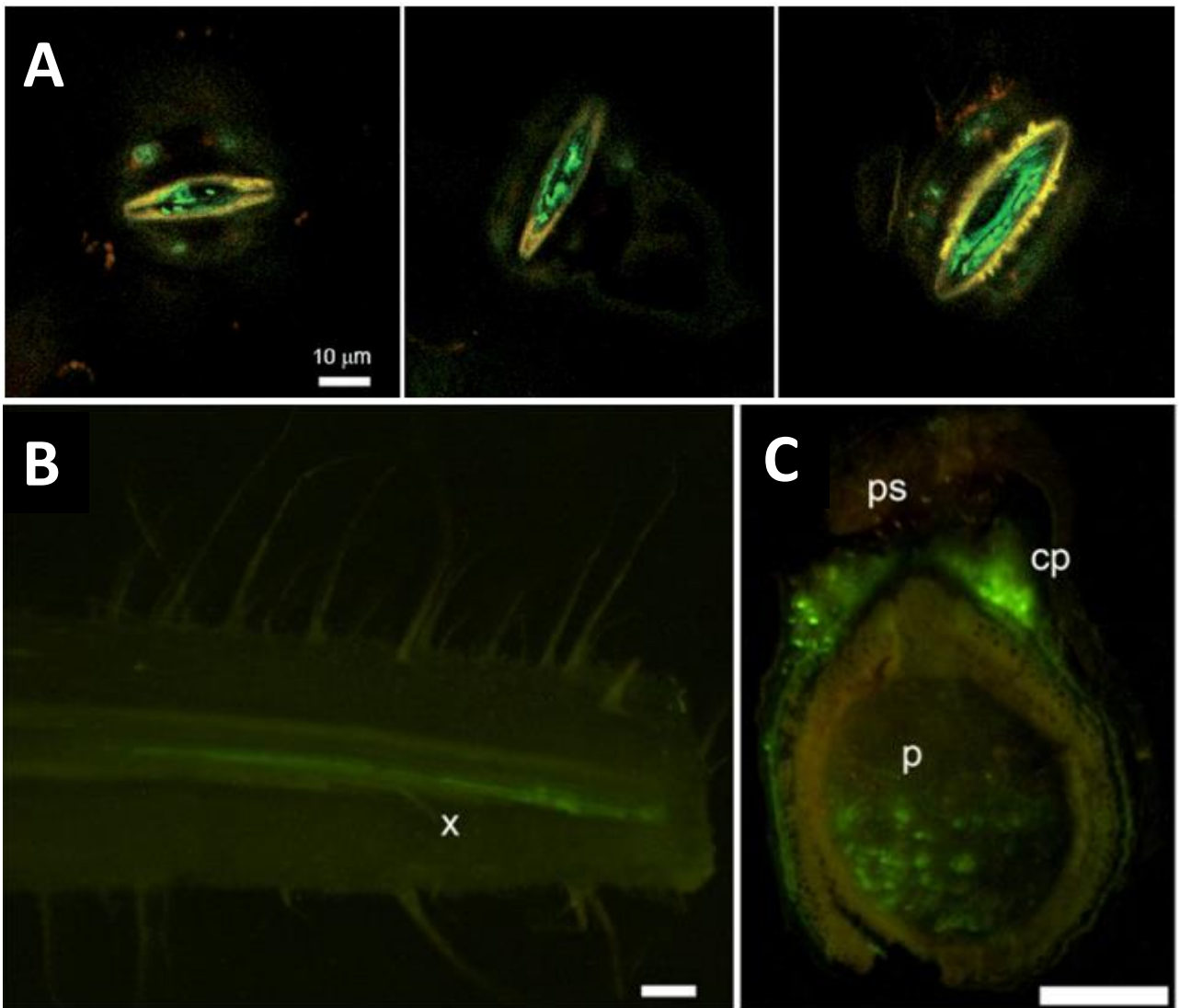


Figure 3-10 Photos de la localisation de souches de *Psa* transformées avec un plasmide exprimant de la GFP dans les stomates et dans le xylème d'*A. deliciosa*.

La signal lumineux correspond à la fluorescence de la GFP, et donc la présence de *Psa* dans des stomates (A); coupe longitudinale de bois révélant la présence de *Psa* dans le xylème (B); coupe transversale de bois révélant la présence de *Psa* dans le xylème (C).

x: xylème; ps: cicatrice du pétiole; cp: parenchyme cortical; p; moëlle. L'échelle correspond à 1 mm pour B et C.

D'après Spinelli *et al.*, 2011, Donati *et al.*, 2014.

3.2.3. Voies d'entrées et de dissémination de *Psa*

a. Voies d'entrée

Tout comme les autres *P. syringae*, *Psa* peut pénétrer dans la plante de différentes façons (Serizawa *et al.*, 1989).

La transformation de souches de *Psa* biovar 3 avec un plamide pDSK-GFPuv (Wang *et al.*, 2007) porteur du gène codant pour une protéine fluorescente, la GFP, a permis de suivre la colonisation de la plante par la bactérie après inoculation (Spinelli *et al.*, 2011). *Psa* a été détectée sur les stomates, les trichomes endommagés, les fleurs (même si le rôle de la fleur dans l'infection reste à ce jour incertain) et dans le xylème (Figure 3-10) (Spinelli *et al.*, 2011, Donati *et al.*, 2014).

Psa dispose d'un set de gènes impliqués dans la dégradation de molécules dérivées de la lignine (constituant de la paroi végétale) et de composés phénoliques impliqués dans la paroi lui permettant d'accéder au contenu des cellules en dégradant la paroi cellulaire (Ferrante & Scortichini, 2015, Di Lallo *et al.*, 2014, Marcelletti *et al.*, 2011).

Enfin, *Psa* peut pénétrer dans la plante via des blessures corrélées aux pratiques culturales, telles que la taille ou l'incision. L'incision, ou « girdling », consiste à enlever une partie de l'écorce sur moins d'un centimètre de hauteur sur toute la circonférence du tronc ou de la charpentière, pour favoriser la productivité de la plante et l'obtention de fruits plus gros (gain d'environ 7g par fruit) (Figure 3-11).

b. Voies de dissémination de *Psa*

❖ Généralités sur les voies de disséminations des *P. syringae*

Les voies de dispersion des *P. syringae* sont multiples et peuvent être favorisées par des facteurs naturels (pluie, vent, insectes, débris végétaux) ou anthropiques (irrigation, machines et outils agricoles, transferts de végétaux).

Différents travaux relatent de la dissémination de la bactérie de proche en proche grâce au vent et à la pluie (Daft & Leben, 1972, Constantinidou *et al.*, 1990). Lorsque les feuilles sont sèches, et avec une vitesse du vent d'au moins 1m/s, les bactéries épiphytes peuvent se retrouver en suspension dans l'air dans des aérosols (Lindemann & Upper, 1985). La bactérie peut également passer de plante à plante par simple contact. Les insectes peuvent également favoriser la dispersion. Stavrinides et collègues ont mis en évidence qu'un aphid (puceron) du pois peut être le vecteur de *P. syringae* pv. *syringae* B728a (Stavrinides *et al.*, 2009).



Figure 3-11 Photo représentative de la technique de "girdling" utilisée pour favoriser la productivité de la vigne.

A: photo d'un « girdling » en cours, la découpe de l'écorce se fait à l'aide d'un outil tranchant (<http://www.groplus.co.nz/>) ; B: cicatrices causées par plusieurs « girdling » sur un tronc d'*Actinidia* (<http://www.scoop.co.nz/stories/SC1101/S00029/kiwifruit-good-news.htm>).

L'insecte ingère la bactérie lorsqu'il pique la plante pour se nourrir, puis la bactérie passe dans le système digestif du puceron et est disséminée *via* le miellat (ou excréments). Les débris végétaux et les adventices peuvent aussi constituer un réservoir pour l'inoculum (Moore, 1988). Il a été montré que des semences contaminées représentent un des moyens les plus importants de dissémination de *P. syringae*, comme dans le cas, par exemple, des graines de haricot. En effet, Taylor et collègues ont mis en évidence qu'un lot de semences faiblement contaminé par *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* pouvait suffire à déclencher une épidémie (Taylor *et al.*, 1979). De même, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* peut être transmis par la semence (McCarter *et al.*, 1983). Et enfin, ces dernières années de nombreuses études ont ciblé des souches de *P. syringae* isolées dans différents milieux aquatiques et dans les nuages. Il semblerait que le cycle de l'eau présente une autre voie de dissémination des *P. syringae* dans l'environnement (Morris *et al.*, 2008).

Dans la propagation d'une maladie due à *P. syringae*, l'homme intervient à trois niveaux. Le premier étant celui de l'irrigation. Il a été démontré que des bactéries phytopathogènes pouvaient être acheminées vers des plants sains *via* l'eau d'irrigation. Dans le cas de la bactériose du melon due à *P. syringae* pv. *aptata*, Riffaud et Morris (Riffaud & Morris, 2002) ont mis en évidence que cette bactérie pouvait survivre dans le bassin de rétention d'eau servant à irriguer les champs, devenant ainsi une source de dispersion de l'inoculum. Le deuxième niveau est la propagation de l'agent pathogène de plante à plante ou de parcelle à parcelle par des machines et des outils agricoles utilisés dans le cadre des pratiques culturales. Lorsqu'une machine agricole est en contact avec un plant malade, de l'inoculum peut s'y déposer et lorsque la machine va être utilisée dans une parcelle saine, elle peut contaminer les plantes saines simplement par contact. Lorsque l'agent pathogène est vasculaire, les outils de tailles représentent un facteur important de dissémination. Par exemple, dans le cadre de la maladie sur olivier causée par *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, il est recommandé de bien désinfecter les outils pour éviter la contamination de plants sains (Quesada *et al.*, 2012). Enfin, le dernier niveau correspond aux échanges de matériel végétal, que ce soit des plants de bouture ou de semences, qui confèrent à l'agent pathogène l'opportunité de pouvoir être transporté sur de longues distances et d'être introduit dans une aire qui n'était pas infectée jusque-là. L'introduction de plants infectés dans des pépinières représente la voie la plus performante, en terme de dissémination, et de nombreux cas inhérents à *P. syringae* ont été recensés (Bultreys & Kaluzna, 2010, Lamichhane *et al.*, 2015).

❖ *Voies de dissémination connues pour Psa*

Le vent, la pluie et le gel sont des facteurs environnementaux qui favorisent l'expansion de l'épidémie. Serizawa et collègues ont remarqué que des pluies accompagnées d'un vent fort favorise la dispersion des exsudats bactériens à partir du site d'infection (Serizawa *et al.*, 1989). Les vergers les plus impactés étaient localisés dans des zones géographiques très ventées. De plus, la présence de haies brise-vent entre deux vergers, semble stopper la dissémination de la bactérie. En effet, la maladie ne fut pas observée dans un verger sain abrité du vent par des haies coupe-vent et qui était à proximité de vergers infectés. Il semble que les colonies épiphytes de *Psa* pourraient être dispersées par le vent dans le milieu de la journée en période chaude et sèche (Froud *et al.*, 2015). En Italie en 2008, les précipitations ont été 30 à 35% plus élevées que la moyenne annuelle, ce qui semble avoir promu la dispersion massive de la bactérie dans les vergers d'*A. chinensis* (Ferrante *et al.*, 2012). Enfin, une étude réalisée sur des vergers en Italie a révélé que les dégâts causés par le gel automnal et hivernal favorisent la multiplication et la migration de *Psa* dans la plante (Ferrante & Scortichini, 2014).

Le pollen, souvent utilisé pour la pollinisation artificielle des vergers pour en accroître la productivité, pourrait être une voie de dissémination de la bactérie. *Psa* a été isolé sur des échantillons de pollen récoltés dans des vergers infectés et non infectés (mais qui ont présenté des signes d'infection l'année suivante) en Italie en 2010 (Vanneste *et al.*, 2011a, Gallelli *et al.*, 2012). Stefani et Giovanardi ont mis en évidence que la pollinisation artificielle effectuée avec du pollen contaminé (4×10^6 ufc/g) conduisait à la dissémination de la bactérie sur les feuilles et les fruits, sur lesquels elle se développe en tant qu'épiphyte (Stefani & Giovanardi, 2012). Cependant, les fruits ne présentent pas une voie de dissémination, *Psa* ne pouvant pas survivre sur leur surface. Le statut du pollen en tant qu'agent de dissémination est encore discuté à ce jour. La récolte du pollen est effectuée avec des aspirateurs qui aspirent également des débris végétaux. Il semblerait plus probable que *Psa* soit présent sur ces débris récoltés en même temps que le pollen, plutôt que sur le pollen.

Le transfert de plants et de matériel de propagation (baguettes pour greffage ou matériel de culture *in vitro*) est probablement la voie la plus importante dans la dissémination à longue distance de la maladie qui a contribué à l'introduction et la dissémination de *Psa* dans différents pays. Cette hypothèse est soutenue par une étude récente qui a révélé la détection de *Psa* biovar 3 dans des plants asymptomatiques de kiwi, 3 ans après que la bactérie ait été inoculée dans le matériel de micropropagation utilisé pour produire ces plants

(Minardi, 2015). La transmission de *Psa* par la semence n'a pas été mise en évidence à ce jour.

Les pratiques agricoles associées à la culture du kiwi peuvent favoriser la dissémination de la bactérie d'arbre en arbre, de vergers en vergers, ou parfois sur de plus longues distances. Ce peut être *via* des outils non désinfectés (utilisés pour tailler, inciser ou pour appliquer des produits protecteurs de blessures), des véhicules ou des machines agricoles, des animaux (*Psa* a été détecté dans des échantillons de sol prélevés sous les pattes de lapins en Nouvelle-Zélande) ou encore lors de l'arrosage sur frondaison utilisé pour lutter contre le gel (Cornish *et al.*, 2015, Froud *et al.*, 2015, Everett *et al.*, 2012). Enfin, il est important après la taille d'enlever les bois taillés car *Psa* a été détecté sur les feuilles et les sarments taillés présents sur le sol des vergers au début de l'hiver et ces débris pourraient jouer un rôle dans la conservation et la dissémination de l'inoculum durant l'hiver (Marcelletti *et al.*, 2011, Tyson *et al.*, 2012).

Concernant les insectes, les abeilles pourraient favoriser la dissémination de la bactérie (Pattemore *et al.*, 2014). *Psa* a été détecté sur l'abdomen de cigales, sur l'abdomen et l'appareil buccal de « mouches à viande » (blowflies), et de cicadelles de la passiflore (Froud *et al.*, 2015). Des études supplémentaires sont nécessaires pour statuer sur le rôle de ces insectes dans la dissémination de la maladie.

3.3. Mécanismes de l'interaction plante-bactérie : les facteurs de virulence

3.3.1. Les interactions plante-bactérie

Les plantes étant des organismes immobiles, elles ont dû développer des mécanismes de défenses performants et inductibles pour faire face aux agressions abiotiques (UV, chocs hydriques, blessures,...) et biotiques (insectes, champignons, virus, bactéries,...). En général, on distingue 4 phases clés lors de l'interaction entre une plante et une bactérie : 1) par chimiotactisme la bactérie est attirée par des exsudats de la plantes; 2) pénétration et installation de la bactérie dans les tissus végétaux ; 3) multiplication de la bactérie dans la plante et éventuellement expression du pouvoir pathogène ; 4) dispersion et transmission des bactéries à un nouvel hôte. Lors d'un contact entre une plante et une bactérie pathogène de cette plante, un dialogue moléculaire s'établit entre les 2 organismes et va déterminer s'il y aura sensibilité ou résistance de la plante.

		Génotype de la plante	
		R	r
Génotype du pathogène	Avr	Incompatibilité	Compatibilité
	avr	Compatibilité	Compatibilité

Figure 3-12 La relation R/Avr : l'hypothèse « gène pour gène » (Flor, 1971).

Avr/R : la protéine de plante R reconnaît la protéine Avr du pathogène, il y a incompatibilité, la plante est résistante et une HR est observée au point d'infection.

avr/R ou avr/r ou Avr/r : la protéine de plante R ne reconnaît pas la protéine Avr ou avr du pathogène, il y a compatibilité, la plante est sensible et il y a développement de la maladie.

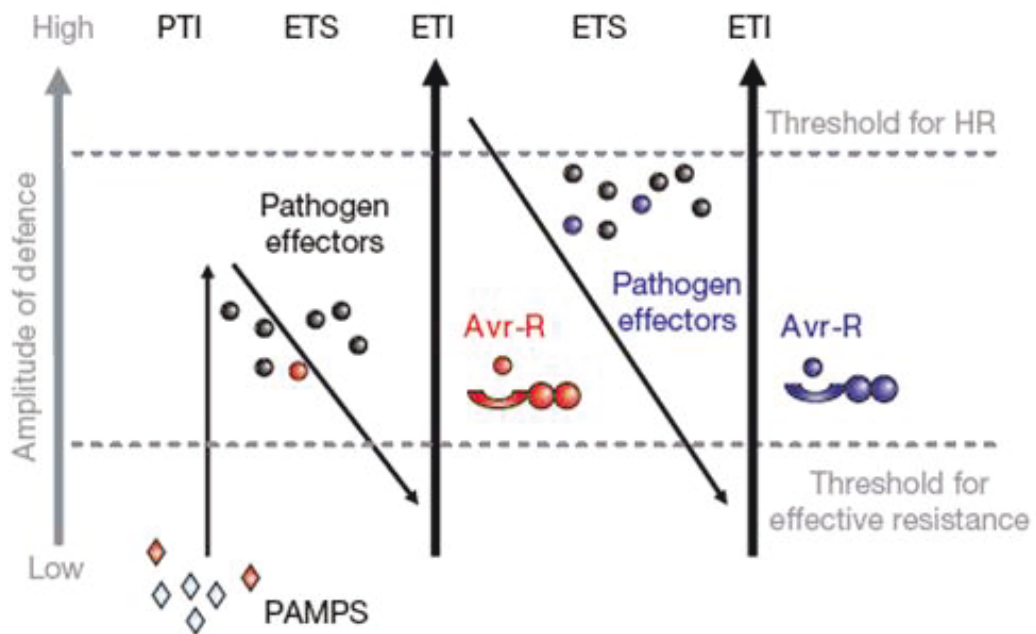


Figure 3-13 Modèle en zigzag de la coévolution du système immunitaire des plantes et du système de virulence des agents pathogènes.

D'après Jones & Dangl, 2006.

Dans le cas d'une interaction dite compatible, l'agent pathogène va se multiplier dans la plante hôte. Celle-ci va réagir plus ou moins efficacement et les symptômes seront plus ou moins marqués. Si la maladie se développe et affecte le développement de la plante, on dit que l'agent pathogène est virulent et la plante est sensible. Dans le cas d'une interaction incompatible, il y a reconnaissance spécifique de la bactérie pathogène par la plante, l'agent pathogène est dit avirulent sur la plante résistante. Selon l'hypothèse « gène pour gène » (Flor, 1971), les plantes possèdent des gènes de résistance (R) qui leur permettent de reconnaître le produit de gènes d'avirulence (Avr) chez les organismes phytopathogènes (Figure 3-12). Dans la plupart des cas, la présence simultanée des gènes R/Avr provoque l'apparition de lésions nécrotiques, localisées au point d'infection, traduisant une réaction dite hypersensible (HR) qui bloque l'infection.

L'interaction plante-pathogène n'est pas une situation figée dans le temps. La coévolution des plantes et des agents pathogènes existe depuis des millions d'années. Pour l'agent pathogène, c'est l'éternelle course à l'armement et pour la plante c'est l'éternelle course au contournement des nouvelles armes déployées par l'agent pathogène. Il existe deux grands types de mécanismes de défense chez la plante :

- les défenses constitutives : comme son nom l'indique, ce sont les défenses qui sont toujours présentes dans la plante, elles ne sont pas induites par une infection. On y inclut les barrières physiques que rencontre l'agent pathogène (cuticule ou paroi des cellules végétales) et les barrières chimiques correspondant à des molécules aux propriétés antimicrobiennes (enzymes, métabolites secondaires) (Nürnberger *et al.*, 2004).

- les défenses inductibles : lorsque l'agent pathogène arrive à pénétrer dans la plante et que sa présence est détectée, il y a induction de mécanismes de défenses. On distingue deux types de réactions de défenses inductibles : la résistance basale ou PTI (PAMP-triggered immunity), et la résistance spécifique ou ETI (effector-triggered immunity).

La coévolution des différents niveaux de résistance des plantes et de virulence des agents pathogènes est illustrée par le modèle en zigzag (Figure 3-13) proposé par Jones et Dangl en 2006 (Jones & Dangl, 2006). Ce modèle peut se découper en 4 phases :

Phase 1. Des récepteurs membranaires de la famille des PPRs (Pattern-Recognition Receptors) de la plante vont reconnaître des motifs moléculaires appelés PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) ou MAMPs (microbe-associated molecular patterns) de la surface de l'agent pathogène. Les PAMPs sont des composants structuraux de l'agent

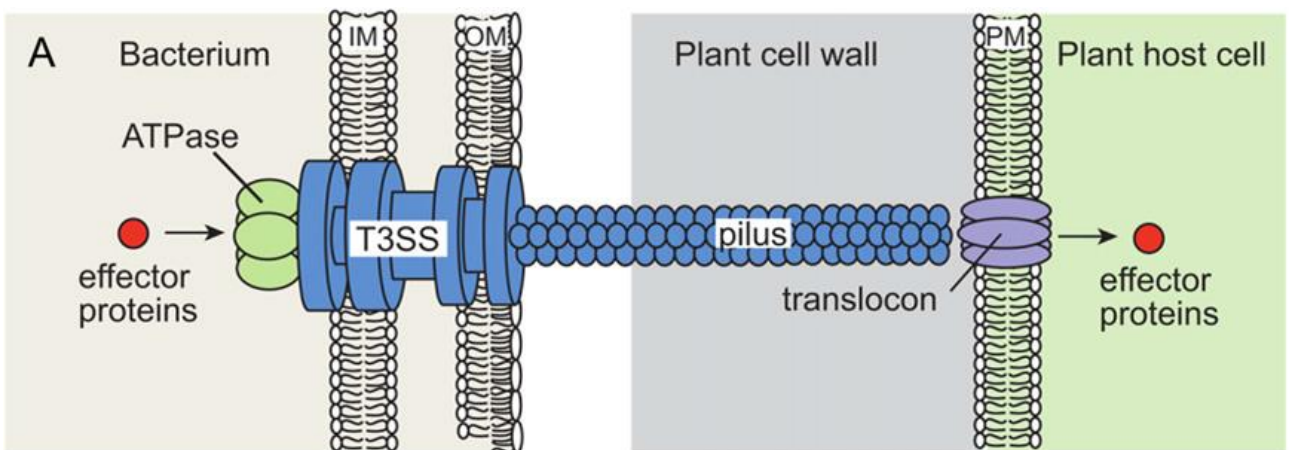


Figure 3-14 Schéma de la structure du SST3 chez les bactéries.

IM : membrane interne de la bactérie; OM : membrane externe de la bactérie ;
 PM : membrane plasmique de la cellule végétale.

D'après Büttner & He, 2009.

pathogène (Nürnberg *et al.*, 2004). Parmi les PAMPs on distingue les LPS (lipopolysaccharides), les EPS (exopolysaccharides), la flagelline ou des facteurs d'élongation. Une fois que les PPRs ont reconnu les PAMPs, une cascade de signalisation va rapidement se mettre en place dans la cellule végétale pour activer la PTI. Il y a alors induction de la transcription de gènes impliqués dans les mécanismes de défense, la production d'espèces réactives d'oxygène et des dépôts de callose qui vont renforcer la paroi végétale (Nürnberg *et al.*, 2004).

Phase 2. Certains agents pathogènes ont su développer des armes pour contourner la PTI : les effecteurs. Lorsque ces derniers sont injectés dans la cellule végétale ils vont interférer avec la PTI. La plante est dite sensible et on parle d'ETS (effector-triggered sensibility).

Phase 3. A son tour, la plante a su développer des protéines de résistance (R) (de type NB-LRR (Dangl & Jones, 2001)) pour désarmer l'agent pathogène. Une protéine R de la plante va reconnaître spécifiquement un effecteur (en rouge sur la figure 3-13), ce qui va activer l'ETI.

Phase 4. A nouveau, les agents pathogènes ont évolué pour supprimer l'ETI et restaurer l'ETS. Cette évolution a pu se faire via la perte d'effecteurs déjà reconnus par la plante et l'acquisition de nouveaux effecteurs (en bleu sur le schéma) par le biais de transfert horizontal de gène(s), par exemple. De son côté, la plante évoluera par la suite, jusqu'à ce que de nouvelles protéines R puissent reconnaître les nouveaux effecteurs et activer ainsi l'ETI.

3.3.2. Système de sécrétion de type III et effecteurs de type III

a. Généralités sur le système de sécrétion de type III ou SST3

Chez les bactéries Gram négatives on distingue six types de systèmes de sécrétion (SST), nommés de I à VI, et un SSTVII a même été décrit chez les mycobactéries (Costa *et al.*, 2015). Les SST permettant aux bactéries d'échanger des molécules avec leur environnement et d'exporter en dehors de la cellule divers facteurs de virulence.

Le système de sécrétion de type III (SST3), présent chez des bactéries qui interagissent en tant qu'agents pathogènes ou mutualistes avec l'homme, dont *Yersinia pestis*, *Salmonella typhimurium*, ou les plantes, dont *P. syringae*, *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas* est bien décrit. Le SST3 (Figure 3-14) permet à la bactérie d'injecter des effecteurs, dits effecteurs de type 3 (ET3s), dans le cytosol de la cellule végétale grâce à une structure moléculaire en

forme de seringue (l'injectisome) capable de traverser la paroi cellulaire végétale. Le SST3 joue un rôle majeur dans la virulence et lorsqu'il présente un dysfonctionnement le pouvoir pathogène de la bactérie est altéré. Le SST3 des *P. syringae* est codé par les gènes du cluster *hrp* nécessaires à la réaction hypersensible et de pathogénie, découverts chez *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Lindgren *et al.*, 1986), ainsi que les gènes de réaction hypersensible conservés ou *hrc* (Alfano & Collmer, 1997). Chez *P. syringae*, les gènes *hrp* et *hrc* sont organisés en cluster sur une même région chromosomique dans un îlot de pathogénie qui a une structure en trois parties (Alfano *et al.*, 2000). Les gènes *hrp/hrc* sont flanqués par un cluster d'effecteurs conservés (CELS) et d'un cluster d'effecteurs interchangeableables (EEL) dont la structure varie entre les pathovars. Il semblerait que *P. syringae* ait acquis le SST3 par transfert horizontal de gènes (Alfano *et al.*, 2000) (Deng *et al.*, 2003) et que cette acquisition ait permis aux bactéries de coloniser rapidement de nouvelles niches et de nouveaux hôtes.

b. Généralités sur les effecteurs de type III ou ET3s

Depuis les années 1980, *P. syringae* est un modèle d'étude des interactions plante-bactérie, ciblant le SST3 mais également des facteurs de virulence tels que les ET3s. Les ET3s, qui sont hôtes spécifiques, altèrent divers processus cellulaires et physiologiques dans la cellule végétale afin de promouvoir la multiplication et la dispersion de l'agent pathogène dans la plante.

Le premier effecteur, *avrA* a été identifié en 1984 chez *P. syringae* pv. *glycinae* (Staskawicz *et al.*, 1984). En 2011, l'analyse de 19 souches de *P. syringae* a révélé l'existence de 58 familles d'effecteurs, dont la distribution diffère en fonction des pathovars (Baltrus *et al.*, 2011).

Les effecteurs ont différentes activités et peuvent être hôtes spécifiques. Ils peuvent cibler des composants de la membrane plasmique, du cytoplasme, de la mitochondrie ou du chloroplaste de la cellule végétale et, entre autres, bloquer la reconnaissance de la bactérie par la plante, induire la suppression des défenses basales de la plante, de la HR, du dépôt de callose sur la paroi ou de la production d'acide salicylique, altérer le transport vésiculaire des protéines du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi et influencer sur le protéome extracellulaire de la plante (Kaffarnik *et al.*, 2009, Deslandes & Rivas, 2012, Jelenska *et al.*, 2007, Xin & He, 2013). Il existe un site internet hébergeant une base de données des effecteurs identifiés chez différents *P. syringae sensu lato* (http://pseudomonas-syringae.org/pst_func_gen2.htm).

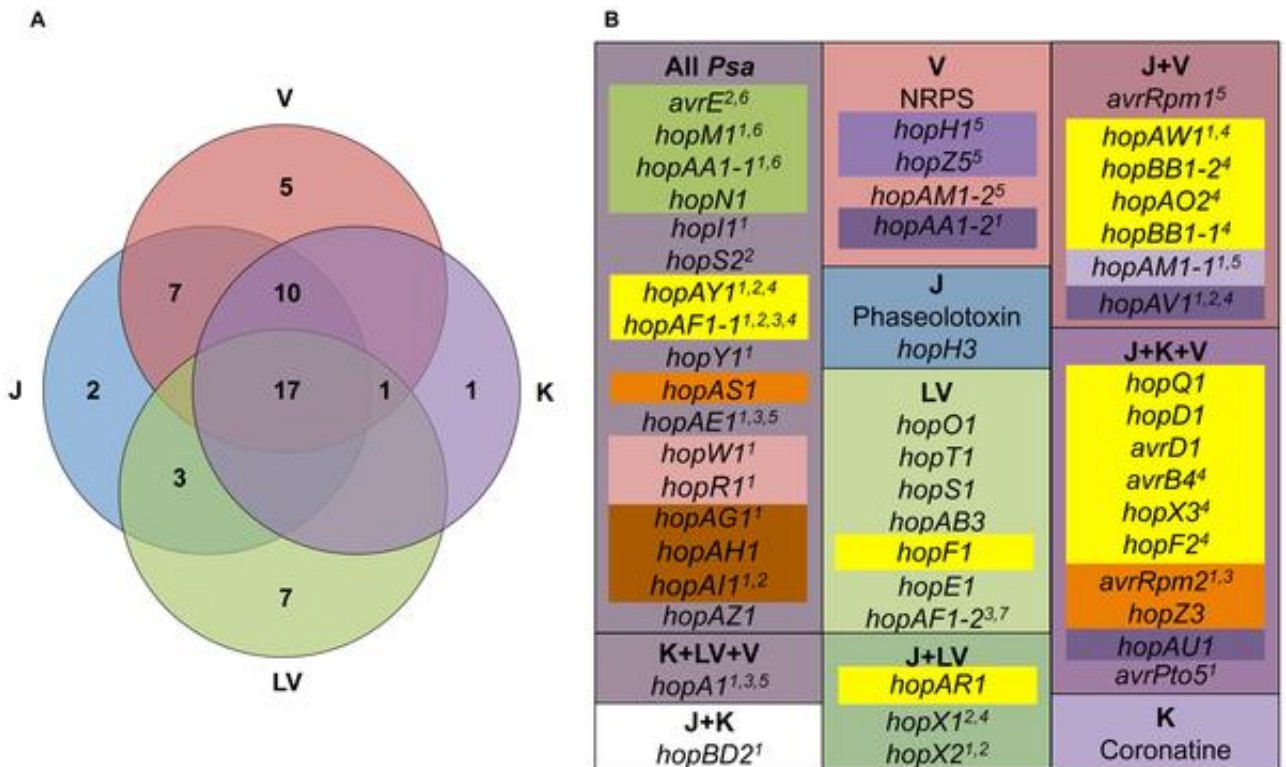


Figure 3-15 Distribution des effecteurs de type 3 chez *Psa*.

A: le nombre indiqué dans chaque région du diagramme de Venn représente les effecteurs de type 3 présents chez les clades *Psa* biovars 1 (J), biovar 2 (K), *Psa* biovar 3 (V) et biovar 4 (LV). B: la couleur des grands rectangles représente la distribution des effecteurs et toxines selon les clades; les couleurs des petits rectangles font référence au nombre de copies dans le génome. ³ et ⁴: effecteur pourrait ne pas être présent chez tous les biovars 2 ou 3.

D'après McCann *et al.*, 2013.

c. SST3 et effecteurs chez Psa

Les souches de *Psa* possèdent des gènes impliqués dans plusieurs types de systèmes de sécrétion : SST1, SST2, SST3, SST4 et SST6. Les répertoires d'effecteurs associés au SST3 sont différents d'un biovar à un autre et pourraient expliquer leur différence d'agressivité.

Marcelletti et collègues ont mis en évidence, qu'entre les biovars 1 et 3, le répertoire commun inclus 33 effecteurs Hop et 6 Avr, et les répertoires spécifiques à chaque biovar incluent chacun 4 effecteurs Hop (Marcelletti *et al.*, 2011). Puis McCann et collègues ont complété ces répertoires avec des souches de biovars 2 et 4 (Figure 3-15) (McCann *et al.*, 2013). Le répertoire commun à tous les biovars comprend 17 effecteurs, certains biovars possèdent des répertoires d'effecteurs en commun et chaque biovar possède un répertoire d'effecteur qui lui est spécifique.

3.3.3. Autres facteurs contribuant à la virulence

Le pouvoir pathogène des *P. syringae* ne se limite pas au SST3, d'autres systèmes y contribuent, tels que les toxines ou le pouvoir glaçogène.

a. Les toxines

P. syringae produit principalement quatre toxines : la coronatine, la phaseolotoxine, la syringomycine et la tabtoxine (Bender *et al.*, 1999). Ces quatre toxines induisent une chlorose ou une nécrose, et la phaseolotoxine est en plus impliquée dans la croissance et la dispersion de la bactérie dans la plante. Durant l'infection de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, la coronatine facilite l'invasion de la plante par la bactérie en inhibant la fermeture des stomates, favorise la multiplication et la persistance de la bactérie dans la plante, induit des symptômes et la sensibilité des parties de la plante qui ne sont pas encore infectées (Xin & He, 2013). Même si les toxines augmentent la sévérité de la maladie (contribution au mouvement systémique de la bactérie, taille des lésions et multiplication de la bactérie dans la plante hôte), elles ne sont pas indispensables à l'établissement de la pathogénie. La production de coronatine est codée par le cluster *cor* (Bender *et al.*, 1999), de phaseolotoxine par le cluster *argK-tox* (Sawada *et al.*, 1997), de syringomycine par le cluster *syr* (Guenzi *et al.*, 1998) et de tabtoxine par le cluster *tab* (Engst, 1992).

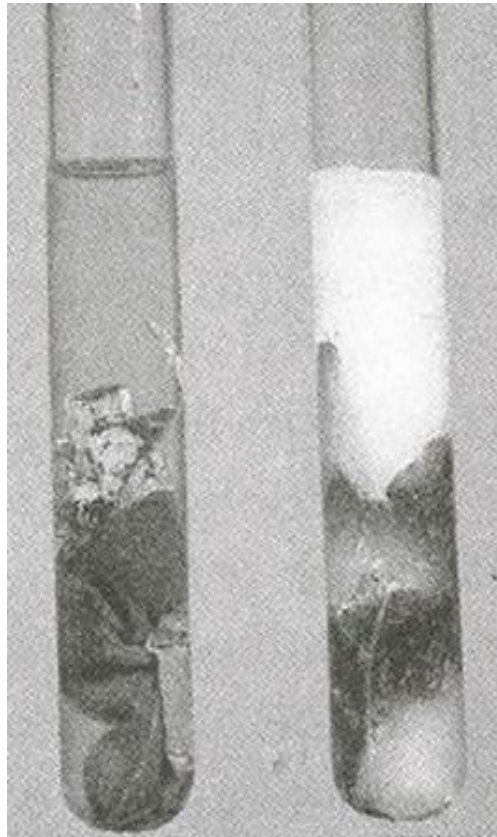


Figure 3-16 Test illustrant le pouvoir glaçogène de souches de *P. syringae* pathogènes du haricot.

Des tubes en verre contenant des feuilles de haricots immergées dans un tampon phosphate ont été placées dans un bain réfrigérant à une température de -2.5°C . Après 30 min l'eau contenue dans le tube de gauche est restée à l'état liquide alors que dans le tube de droite elle s'est solidifiée. La population de bactéries INA⁺ dans le tube de droite est bien plus importante que dans le tube de gauche, ce qui a permis une solidification de l'eau à une température de -2.5°C .

D'après Hirano & Upper, 1992.

Un peu plus récemment, en 2003 et 2007, deux autres toxines ont été identifiées : la mangotoxine chez *P. syringae* pv. *syringae* qui provoque des nécroses apicales sur manguier (Arrebola *et al.*, 2003), et la syringofactine chez *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, un surfactant qui facilite l'accès aux nutriments et la mobilité par swarming de la bactérie (Berti *et al.*, 2007, Burch *et al.*, 2014).

Les souches de *Psa* bv1 produisent de la phaseolotoxine tandis que les souches de *Psa* biovar 2 produisent de la coronatine ; alors que les souches de *Psa* biovar 3 et biovar 4 ne produisent pas de toxine connue.

b. Pouvoir glaçogène

Il est possible de maintenir l'eau ultra pure en surfusion jusqu'à -40°C. Cependant dans la nature il est impossible de trouver de l'eau ultra pure car elle est en contact avec de nombreuses particules, dont des noyaux dits de cristallisation ou glaçogènes, qui peuvent provoquer une rupture de la surfusion à des températures négatives de -10°C (cristaux de composés inorganiques, tels que poussière, minéraux) ou -5°C (cristaux de composés organiques, tels qu'acides aminés, protéines ou terpènes) (Gaignard & Luisetti, 1993). En 1973, Fresh démontra l'existence de noyaux de cristallisation d'origine biologique sur végétal provoquant des gelées à des températures plus élevées que la normale se situant entre -2 à -4 °C. Un an plus tard, Maki et collègues (Maki *et al.*, 1974) identifièrent l'agent biologique responsable : une souche de *P. syringae*. Le pouvoir glaçogène ou INA (Ice Nucleation Activity) présente un avantage pour les bactéries de la phyllosphère qui leur permet de pénétrer facilement dans la feuille en créant des lésions (Lindow, 1983). Tous les pathovars de *P. syringae sensu lato* n'ont pas d'INA. Des souches INA (INA⁺) ont été recensées chez les souches du genomospécies de *P. syringae*, chez des souches de *P. fluorescens* et de *P. viridiflava*. Hirano et Upper ont mis en évidence le pouvoir INA⁺ de souches de *P. syringae* présentes à la surface de feuilles de haricot (Figure 3-16) (Hirano & Upper, 1992).

La protéine responsable de l'INA est ancrée dans la membrane externe de la bactérie et est codée par le gène *inaZ* (Green & Warren, 1985). Deux hypothèses s'opposent quant à l'origine de ce gène. La première implique l'acquisition du gène par transfert horizontal (Hirano & Upper, 2000). La deuxième, bien plus récente, implique la présence de ce gène dans un ancêtre commun (Morris *et al.*, 2010, Morris *et al.*, 2013).

Aucune souche de *Psa* ne possède cette propriété (Takikawa *et al.*, 1989).

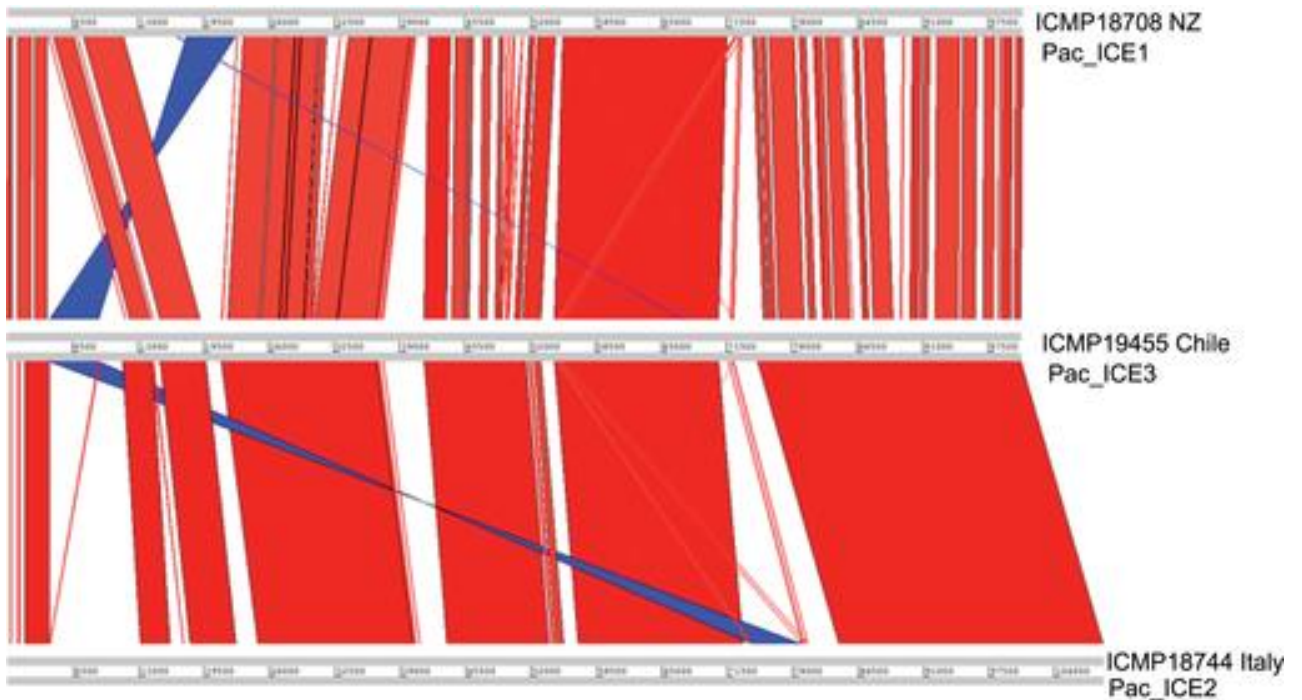


Figure 3-17 Comparaison des apuitments des séquences des trois ICEs décrits chez *Psa* biovar 3.

ICMP 18708: souche isolée en Nouvelle-Zélande; ICMP 19455: souche isolée au Chili; ICMP 18744: souche isolée en Italie.

Les comparaisons ont été obtenues avec le logiciel Artemis Comparison Tool.

D'après Butler *et al.*, 2013.

c. *Élément conjugatif et intégratif (ICE)*

Un îlot génomique similaire à PPHGI-1 décrit chez *P. syringae* pv. *phaseolica* (Pitman *et al.*, 2005) a été identifié chez les souches de *Psa* biovar 3 isolées en Europe et en Chine (Mazzaglia *et al.*, 2012). Butler et collègues ont mis en évidence que cet îlot génomique d'environ 100 kb contient plusieurs ORFs prédites pour être impliquées dans l'intégration et la conjugaison, et qu'il est flanqué par des sites de type *attL* et *attR*, autant d'éléments qui permettent de conclure que c'est un ICE (integrative and conjugative element). Cet ICE fut nommé Pac_ICE pour *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Des ICEs ont déjà été décrits chez des bactéries phytopathogènes, telles que *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Pitman *et al.*, 2005), ou plus récemment chez *Pantoea ananatis* (agent pathogène d'une large gamme d'hôte incluant le riz, le maïs, l'oignon et l'eucalyptus) (Coutinho & Venter, 2009, Maayer *et al.*, 2015). Comme les plasmides, les bactériophages et les transposons, un ICE est un élément génétique mobile qui influe sur la fitness des bactéries, pouvant aider les microorganismes à coloniser de nouvelles niches (Aminov, 2011). Les ICEs sont des éléments qui possèdent la machinerie génétique requise pour s'auto-intégrer dans un génome hôte, de s'auto-exciser et se circulariser pour s'auto-transférer par conjugaison à d'autres bactéries (Burrus *et al.*, 2006). Enfin, dans un ICE on peut retrouver des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène, l'adaptation métabolique, la production de métabolites secondaires et la résistance aux antibiotiques et métaux lourds (Burrus *et al.*, 2002).

Butler et collègues ont mis en évidence la présence de trois ICEs, différents en termes d'insertions et délétions, au sein de *Psa* biovar 3: Pac_ICE1 (présent chez des souches néo-zélandaises et quatre souches chinoises), Pac_ICE2 (présent chez des souches italiennes et une souche chinoise) et Pac_ICE3 (présent chez des souches chiliennes) (Figure 3-17).

Chez *P. syringae* pv. *phaseolica* la présence de gènes en lien avec le pouvoir pathogène (gène d'effecteur) a été identifié dans l'îlot génomique PPHGI-1. Chez *Psa*, aucun gène d'effecteur n'a été recensé dans les ICEs, mais on distingue la présence d'ORFs hypothétiques conservés dans d'autres espèces de *Pseudomonas* et des ORFs de fonctions inconnues absentes chez tous les *Pseudomonas*. Mais il y a également des ORFs propres à chaque ICE qui codent pour des protéines, telles qu'une C5-specific DNA methylase chez Pac_ICE1 ou trois protéines de résistance à l'arsenic chez Pac_ICE2. Un Pac_ICE4 a été identifié chez une souche de *Psa* biovar 1 isolée au Japon et diffère des autres ICEs, entre autres, de par l'absence d'un transposon qui aurait été récemment acquis par les trois autres Pac_ICEs. Aucun ICE n'a été détecté au sein de souches de *Psa* biovar 2 ou biovar 4.

3.4. Méthodes de lutte contre le chancre bactérien du kiwi, *Psa*

Il n'existe pas de méthode de lutte curative du chancre bactérien du kiwi, aussi la gestion des maladies repose essentiellement sur des méthodes de prévention.

a. Lutte préventive : conduites culturales

La première méthode de lutte culturale est basée sur la prospection et l'observation. Il est important de régulièrement passer dans les vergers afin d'observer le plus tôt possible les premiers symptômes pour pouvoir réagir au plus vite. Il convient également de marquer, avec une bombe de peinture les plantes infectées pour suivre l'évolution des symptômes dans le temps après l'élimination des rameaux ou cannes présentant des symptômes.

Lorsque *Psa* est détecté dans un verger, il faut abaisser au maximum la pression d'inoculum en éliminant les parties infectées pour limiter, voire arrêter, la propagation de la maladie. Selon les symptômes observés et leur intensité, les parties de la plante qui vont être coupées seront les cannes, les charpentières, le tronc (au-dessus ou au-dessous du point de greffe) jusqu'à aller à l'arrachage de la plante, et il est recommandé de couper 80 cm en dessous des derniers symptômes (Note de service du Ministère de l'Agriculture français DGAL/SDQP/N2011-8083).

Des mesures prophylactiques doivent être mises en place dans les vergers afin d'en assurer l'état sanitaire et de limiter la propagation de la maladie. Il faut désinfecter les outils de taille, enlever et brûler le matériel végétal infecté qui a été coupé (Balestra *et al.*, 2010a). L'application de peinture cicatrisante sur les blessures générées par la taille permet de limiter les voies d'entrées pour la bactérie.

La propagation de la bactérie étant favorisée par l'eau, il convient de préférer l'arrosage par goutte-à-goutte plutôt que l'aspersion et de trouver d'autres alternatives que l'arrosage par frondaison pour lutter contre le gel.

Une nouvelle technique de conduite culturale semble limiter l'infection et la propagation de la bactérie dans un verger : la mise en place de bâches en plastiques sur le verger. Cela permet de limiter la dissémination de *Psa* par le vent et la pluie (Froud *et al.*, 2015). Mais son application paraît difficile pour plusieurs raisons. D'une part, l'effet de serre va accélérer la croissance végétative et amener à augmenter le nombre d'interventions culturales dans le verger (taille, période de récolte avancée, gestion du couvert végétal des adventices qui risque d'augmenter l'utilisation d'herbicides). D'autre part, d'un point de vue

économique, l'investissement reste trop conséquent et peu accessible pour de petits producteurs.

b. Bactéricides : traitements cupriques, antibiotiques et autre produits chimiques

La réglementation des produits phytosanitaire est propre à chaque pays ou communauté. Elle diffère de par les produits utilisables, les périodes, doses et nombre d'applications. En Europe l'utilisation des antibiotiques est interdite, alors qu'ils sont autorisés en Nouvelle-Zélande ou en Chine par exemple.

Le cuivre est un métal lourd nécessaire au fonctionnement des organismes vivants mais toxique à forte doses. En agriculture il est utilisé en tant que fongicide et bactéricide. Le cuivre a été un des premiers produits testés pour lutter contre le chancre bactérien du kiwi (Takikawa *et al.*, 1989). Afin de protéger au mieux les vergers de kiwi, il convient d'appliquer des traitements cupriques au printemps et en automne, soit durant les périodes propices au développement de la maladie. En été, la bactérie est moins active et les risques de phytotoxicité dus aux applications de cuivre sont les plus élevés. La phytotoxicité peut toucher les feuilles et les fruits, et d'une manière générale affaiblir la plante. Afin de prévenir l'apparition de bactéries résistantes, ce qui a déjà été observé chez d'autres *P. syringae* (Sundin *et al.*, 1989, Cooksey, 1990), il convient de respecter les doses recommandées et de ne pas aller en-dessous de ces doses. La présence de gènes de résistance au cuivre *copA* et *copB* a été identifiée au sein de souches de *Psa*, mais les deux gènes essentiels à une résistance maximale *copR* et *copS* n'ont pas été mis en évidence (Goto *et al.*, 1994, Nakajima *et al.*, 2002, Marcelletti *et al.*, 2011).

L'antibiotique le plus utilisé dans les pays asiatiques et en Nouvelle-Zélande est la streptomycine, qui peut être appliqué par pulvérisation ou injecté dans le tronc, comme ce fut le cas en Corée du sud (Koh *et al.*, 1996, Onorato *et al.*, 2010). Des souches résistantes à cet antibiotique ont à ce jour uniquement été isolées au Japon lors de la première épidémie causée par *Psa* biovar 1 (Nakajima, 1995). Cependant, les applications répétées de streptomycine pour traiter l'épidémie actuelle pourraient conduire à terme à l'apparition de souches résistantes. L'utilisation de la streptomycine depuis plusieurs dizaines d'années pour lutter contre le feu bactérien causé par *Erwinia amylovora*, dans des pays tels que la Nouvelle-Zélande, les Etats-Unis ou Israël, a participé à la sélection naturelle de souches résistantes. La streptomycine agit en se fixant de façon irréversible aux ribosomes de la bactérie, ce qui bloque la synthèse de protéines et deux mécanismes de résistance ont été mis en évidence

(Stockwell and Duffy, 2012). Le plus commun est une mutation spontanée du gène chromosomique *rpsL* qui code pour la production d'une protéine ribosomique et qui prévient la fixation de la streptomycine, immunisant ainsi la bactérie. Le second est l'acquisition par la bactérie d'un plasmide comprenant deux gènes positionnés en tandem *strA* et *strB* qui codent pour la production d'une phosphotransférase aminoglycoside qui inactive la streptomycine. La détection des gènes *strA* et *strB* associé à un transposon, Tn5393, ont été détectés au sein de plusieurs genres de bactéries associées aux plantes dans différents environnements, telle que *P. syringae* pv. *papulans* (Chiou & Jones, 1993).

Les AMPs, pour Antimicrobial peptides sont des composants conservés (en terme d'évolution) du système immunitaire d'organismes multicellulaires complexes (Zasloff, 2002). Ce sont en général des peptides composés de 50 acides aminés (défensines, protéines PR,...) qui participent aux premiers mécanismes de défenses mis en place par les plantes. Concernant la lutte contre *Psa*, la production d'AMPs synthétiques est à l'étude. Une librairie de 300 AMPs a été testée *in vitro* sur *Psa* et plusieurs peptides utilisés sur des plants infectés ont révélé une efficacité d'action comparable à celle des antibiotiques ou du cuivre (Montesinos, 2015).

De nombreux produits chimiques ou biologiques ont été testés sans qu'il n'y ait eu d'impacts significatifs sur la maladie. Il semblerait que le chitosan, bio-polymère non toxique obtenu après une N-deacétylation de la chitine (composant principal de la paroi cellulaire des champignons et de l'exosquelette des crustacés) ayant des propriétés antimicrobiennes, soit prometteur en guise d'alternative aux traitements cupriques (Scortichini, 2014).

En conclusion, à ce jour aucun produit de traitement curatif du chancre bactérien du kiwi n'a été trouvé. Cependant, l'utilisation du cuivre en combinaison avec l'application de compost reste une solution pour prévenir et diminuer le développement et la propagation de la maladie (Monchiero *et al.*, 2015).

c. Lutte biologique : Bactériophages et antagonistes

Les bactériophages, entité biologique la plus abondante sur la Terre (Rohwer, 2003), sont des virus qui n'infectent que les bactéries, peuvent lyser et tuer leur cellule hôte. Les bactériophages ont déjà été utilisés pour lutter contre les bactéries phytopathogènes et certains sont même commercialisés. Par exemple, AgriPhageTM (produit par OmniLytics) est utilisé dans la lutte contre *P. syringae* pv. *tomato* (Balogh *et al.*, 2003). Diverses études ont révélés de bons candidats pour lutter contre *Psa* mais aucun produit n'a encore été commercialisé (Di

Lallo *et al.*, 2014, Frampton *et al.*, 2014 - 2015). De plus, pour éviter l'apparition de résistance aux phages, il est essentiel que le produit de traitement soit composé d'un cocktail de plusieurs bactériophages différents.

D'autres antagonistes à *Psa* semblent prometteurs, tels que *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* et *Pantoea agglomerans* (Donati *et al.*, 2014). Des tests effectués en serre montrent que ces bactéries peuvent prévenir de l'infection et réduisent le nombre de symptômes sur feuilles, mais seulement lorsque la plante est faiblement contaminée. D'autres analyses sont nécessaires pour confirmer l'action de ces agents dans le cadre de la lutte contre *Psa*.

d. Stimulateurs de défense

Les éliciteurs de défense sont des molécules qui vont activer le système de défense des plantes en agissant comme un vaccin (par exemple activation de la résistance systémique acquise, la voie de l'acide salicylique). Parmi les éliciteurs de défense des plantes testés sur *Psa*, l'acibenzolar-S-méthyl (ASM) plus connu sous le nom de Bion[®] ou Actigard[®] (Syngenta) semble présenter les meilleurs résultats (Reglinski *et al.*, 2013). L'efficacité de l'ASM a déjà été démontrée sur *P. syringae* pv. *tomato* (Louws *et al.*, 2001).

e. Lutte génétique : création de variétés plus tolérantes ou résistantes

Le premier génome d'*Actinidia* (*A. chinensis*), séquencé en 2013, représente une source d'informations qui vont aider les sélectionneurs (Huang *et al.*, 2013). La caractérisation et la cartographie de gènes de résistance et de défense chez *A. chinensis* va permettre au sélectionneur d'utiliser la sélection assistée par marqueurs dans ses programmes et d'avoir un aperçu de la composition en gènes de résistance et de défense de son germoplasme (Fraser *et al.*, 2015). Même si l'objectif à ce jour est d'identifier des cultivars moins sensibles, il est important de conserver tous les traits liés aux fruits (goût, forme, calibre,...) ou à la plante (productivité, architecture,...). Une étude a notamment mis en évidence une corrélation négative entre la résistance à la bactérie et le nombre de fruits par plante dans des populations d'*A. chinensis* (Cheng, 2014).

Le premier foyer de *Psa* détecté en Nouvelle-Zélande était localisé dans la Bay of Plenty, le berceau du kiwi néo-zélandais. C'est dans cette localité que se trouvait un verger d'essai de création variétale. Lorsque la maladie s'est propagée dans ce verger d'essai, il y a eu une « sélection naturelle » des cultivars les moins sensibles. Le hasard a ainsi permis de

tester en plein champ les nouveaux cultivars en cours de sélection et de les sélectionner en fonction de leur sensibilité à *Psa*. A ce jour, le cultivar *A. chinensis* cv. 'Gold3' (créé avant l'épidémie de *Psa* biovar 3) a été proposé en remplacement du cultivar *A. chinensis* cv. 'Hort16A', car beaucoup moins sensible. Mais pour le moment il n'y a pas eu d'autres cultivars commercialisés moins sensibles.

4. Biosurveillance de Psa

4.1. Outils de diagnostic et de détection

Le développement d'outils de diagnostic performants d'un agent pathogène et la mise en place de méthodes de lutttes efficaces dépendent de la connaissance de l'agent pathogène responsable de la maladie. Cela passe par la caractérisation de son cycle de vie, de son mode de propagation et surtout de son identification précise et de la mesure de sa diversité.

4.1.1. Diagnostic au champ

La prospection au champ constitue la première étape du diagnostic qui va permettre de poser des hypothèses sur l'identité de l'agent pathogène responsable des symptômes. L'observation des symptômes (type de symptômes, surface de la parcelle touchée, évolution des symptômes dans le temps) vont permettre de déterminer s'ils sont la conséquence d'un stress abiotique (conditions climatiques, pratiques culturales,...) ou biotique (insectes, champignons, virus, bactéries,...).

Afin de poser les bonnes hypothèses, il est important de prendre en compte d'autres facteurs, tels que (Lepoivre, 2003):

- la culture impactée : détermination de l'espèce et de la variété touchée, qui permettra de déterminer une gamme d'agents pathogènes potentiels ;
- le stade physiologique de la culture : les symptômes causés par l'agent pathogène ne sont pas les mêmes en fonction du stade physiologique de la plante ;
- la répartition des plantes malades : peut donner des informations sur le mode de propagation de la maladie ;
- les conditions climatiques : qui peuvent favoriser le développement d'un agent pathogène en particulier ;
- les précédents culturaux : dates de semis, traitements, amendements, travaux du sol, les cultures précédentes (en cas de rotation de culture) ;
- les données pédologiques : nature du sol, composition du sol (type de minéral, pH,...) ;
- la flore environnante : les plantes aux abords de la culture peuvent représenter des réservoirs pour certains agents pathogènes.

4.1.2. Diagnostic et tests de détection en laboratoire

Une fois que le diagnostic au champ a été réalisé et que les hypothèses ont été posées, il faut procéder à un échantillonnage pour confirmer le diagnostic au laboratoire. Il est primordial que l'échantillonnage soit réalisé avec soin, que les échantillons ne soient pas abîmés et envoyés rapidement au laboratoire. En effet, des échantillons abîmés ou fermentés peuvent altérer la qualité des tests effectués en laboratoire et nuire à la réussite de l'identification.

Dans la limite du possible il est préférable de prélever le plant entier afin d'avoir une vision d'ensemble de la plante et des différents symptômes. Le cas échéant, il convient de prélever l'organe atteint en laissant de la marge de part et d'autre du symptôme. Il est judicieux d'échantillonner à différents stades de la maladie pour avoir une vue d'ensemble des symptômes (taille, types d'organes de la plante touchés,...) et de leur évolution (Lepoivre, 2003).

Les tests réalisés au laboratoire se distinguent en 3 catégories : les tests biologiques, les tests sérologiques et les tests moléculaires. Les tests sérologiques ne sont pas adaptés pour développer un outil de diagnostic pour les pathovars de *P. syringae sensu lato*, y compris pour *Psa*. Les serovars définis chez *P. syringae* ne se superposent pas aux pathovars.

a. Caractérisation biologique : morphologie et phénotype

La première étape consiste à isoler l'agent pathogène à partir des tissus infectés de la plante et de le mettre en culture sur un milieu de croissance sélectif. Lorsque la bactérie est difficilement cultivable, une caractérisation moléculaire par PCR directe à partir du macérât (broyage de l'échantillon symptomatique dans de l'eau stérile) ou à partir des ADNs extraits va permettre de l'identifier.

Dans le cadre de *Psa*, l'isolement est réalisé à partir d'échantillons symptomatiques de feuilles ou de bois, préalablement désinfectés avec du coton hydrophile imbibé d'éthanol à 70% afin de s'affranchir de la microflore saprophyte. Un prélèvement est effectué avec un scalpel stérilisé, pour les feuilles comme pour les échantillons ligneux on cible les parties saines en marge de la nécrose (la bactérie ne se situant plus au niveau de la zone nécrotique mais de part et d'autres de celle-ci). Les prélèvements sont ensuite dilacérés au scalpel stérilisé dans 1 à 2 mL d'eau distillée stérile. Puis 100 µL du macérât est étalé sur boîte de Pétri contenant du milieu B de King (King *et al.*, 1954) modifié supplémenté de cycloheximide (0,018%) et d'acide borique (0,136%), (milieu adapté par le LSV d'Angers).

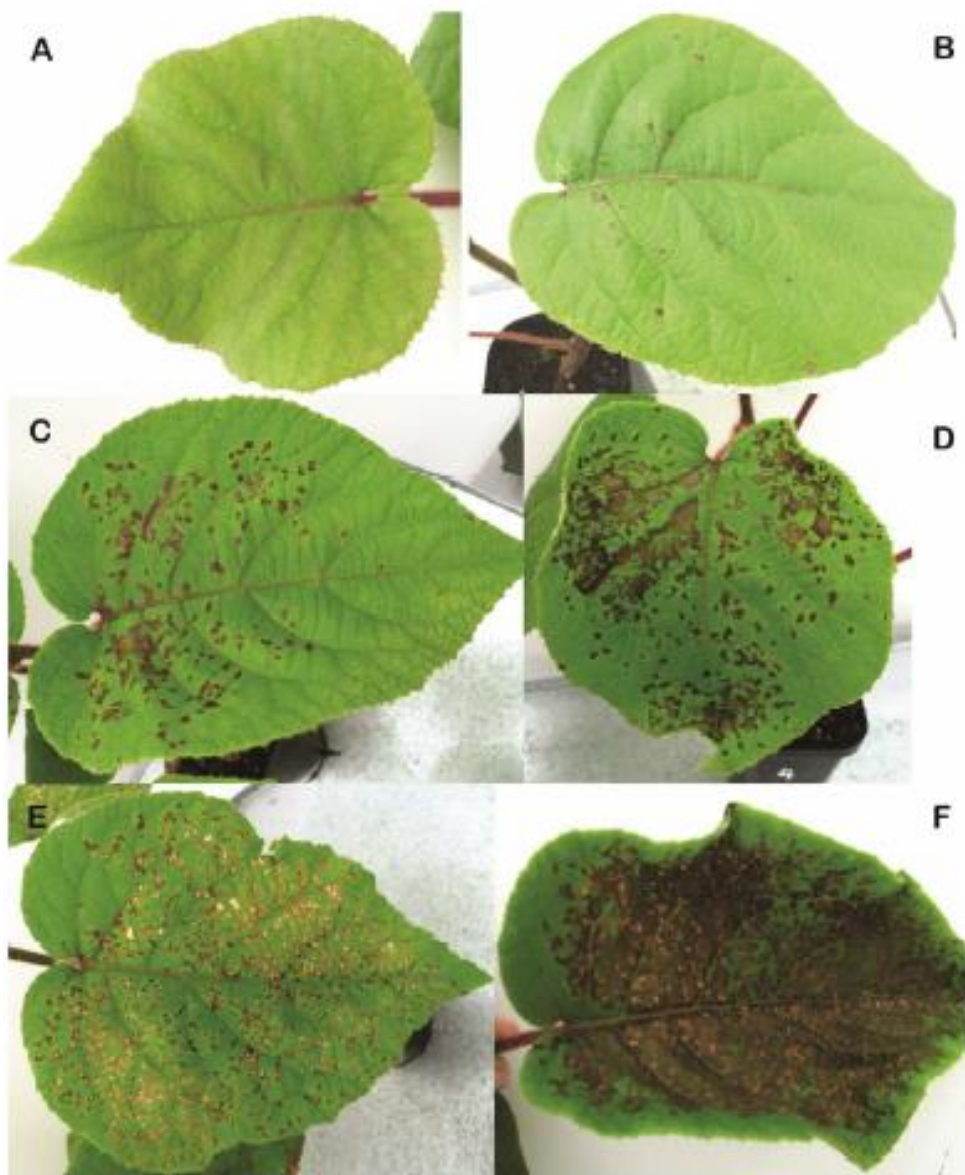


Figure 4-1 Echelle de notation des symptômes observés sur feuilles d'*Actinidia deliciosa* 'Bruno' après inoculation par pulvérisation de souche de *Psa* à 10^9 UFC/mL.

L'échelle de notation va de 0 à 5 selon la surface révélant des nécroses: A =0 pour 0% de nécroses; B: 1 pour 1 à 10% de nécroses, C: 2 pour 11 à 25% de nécroses; D: 3 pour 26 à 50% de nécroses; E: 4 pour 51 à 75% de nécroses; F: 5 pour plus de 75% de nécroses.

D'après Vanneste *et al.*, 2013.

Les boîtes sont ensuite mises à l'étuve à 25°C. Au bout de 3 à 6 jours des colonies apparaissent. Il convient de purifier une colonie afin de s'assurer qu'elle ne soit pas en mélange et pour poursuivre la caractérisation à partir de matériel pur.

La caractérisation du pouvoir pathogène est une étape indispensable. Koch énonça 4 postulats en 1881, à partir de maladies infectieuses de l'homme, qui sont transposables aux maladies infectieuses des végétaux. Des tests de pouvoir pathogène réalisés en laboratoire, avec l'agent responsable de la maladie qui a été isolé, vont permettre de répondre au 4^{ème} postulat : « l'agent pathogène doit pouvoir être ré-isolé de plantes expérimentalement infectées ». Il existe de nombreuses méthodes de test de pouvoir pathogène et dans le cadre de *Psa*, deux sont principalement utilisés : inoculation par pulvérisation des surfaces foliaires (préalablement blessées ou non) ou inoculation de la tige par piqûre avec une aiguille préalablement trempée dans l'inoculum ou par dépôt d'une goutte d'inoculum au point de piqûre. Dans les deux cas d'inoculation la concentration de l'inoculum est comprise entre 10^7 et 10^9 UFC/mL (Takikawa *et al.*, 1989, Serizawa *et al.*, 1989). Les plants inoculés sont âgés de 3-6 mois à quelques années. Les symptômes apparaissent entre une dizaine de jours et 1 mois, et la quantification des symptômes sur feuilles peut se faire selon le pourcentage de la surface foliaire impactée (Figure 4-1) et sur tige selon l'état de la plante (water soaking, nécrose, flétrissement de la plante) (Vanneste *et al.*, 2013).

b. Caractérisation moléculaire

L'adaptation de la méthode de la PCR pour la caractérisation et l'identification des agents pathogènes a permis de faire un bond en avant dans le diagnostic des maladies des plantes. Son utilisation représente un gain de temps par rapport aux tests classiques d'identification car elle peut être utilisée, dans certains cas, directement sur les ADN extraits à partir du macérât des tissus symptomatiques. Les critères de performance d'une méthode de détection par PCR dépendent de la préparation des échantillons (méthode d'extraction des acides nucléiques), du choix des gènes ciblés et des couples d'amorces, de l'optimisation de la réaction PCR et de la méthode de détection des produits d'amplification.

Il existe différents types de PCR, dont la PCR en point final (révélation des produits d'amplification sur gel d'agarose ou d'acrylamide), la PCR en temps réel (suivi par fluorescence en temps réel des produits d'amplifications générés durant chaque cycle du programme) qui peut permettre une quantification directe des séquences cibles dans

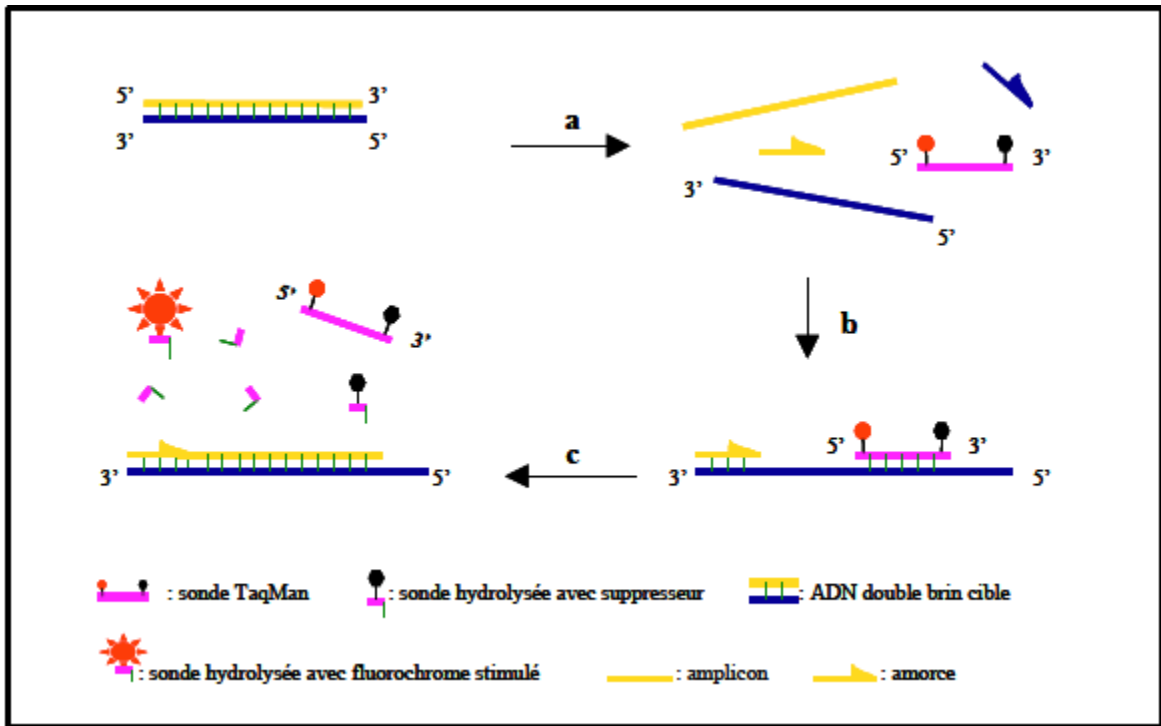


Figure 4-2 Schéma de l'hydrolyse de la sonde Taqman.

a: lors de la première étape de la PCR, la dénaturation, la sonde est libre en solution; b: lors de l'étape d'appariement, les primers et la sonde vont s'hybrider spécifiquement sur la région cible de l'ADN et la proximité entre le rapporteur (point rouge sur la sonde) et le quencher (point noir sur la sonde) empêche l'émission de fluorescence; c: lors de l'étape de polymérisation, la Taq polymérase va hydrolyser la sonde et libérer le rapporteur qui, n'étant plus à proximité du quencher, va pouvoir fluorescer et c'est à cette étape-là que la fluorescence est mesurée.

D'après Poitras et Houde, 2002.

l'échantillon en intégrant une gamme étalon ou la Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP) qui permet une amplification à température constante de l'ADN cible.

Différentes technologies existent pour la PCR temps réel, utilisant des agents se liant à l'ADN (SYBER Green I) et les sondes fluorescentes utilisées dans quatre technologies différentes (Taqman, HybProbes, Molecular Beacons et Scorpion). La technologie Taqman (Figure 4-2) (Poitras & Houde, 2002) exploite l'activité 5' exonucléasique de la Taq polymérase pour cliver une sonde hybridée à sa séquence cible durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR (Heid *et al.*, 1996). La sonde possède à l'extrémité 5' un fluorochrome émetteur, le *reporter*, dont l'émission est inhibée par un fluorochrome suppresseur, le *quencher*, fixé à l'extrémité 3' de la sonde. Lorsque les amorces et la sonde s'hybrident sur l'ADN cible, la Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN, libère le reporter qui est éloigné du quencher et peut émettre de la fluorescence qui est mesurée après chaque cycle PCR. Il est possible de réaliser la PCR temps réel en multiplex, en utilisant différents fluorochromes (5 au maximum). L'utilisation de la sonde en plus du couple d'amorces permet de gagner en spécificité, par rapport à une PCR en point finale n'utilisant que le couple d'amorces.

La LAMP permet à partir de quelques copies d'ADN de générer 10^9 copies dans des conditions isothermiques à 65°C et avec une bonne spécificité grâce à l'utilisation combinée de 6 amorces générant des produits d'amplification en mélange d'ADNs de forme tige/boucle de longueurs différentes et de structure en forme de chou-fleur (Notomi *et al.*, 2000). La LAMP est un outil de diagnostic avec une portabilité au champ. Il est possible, en disposant d'un bloc chauffant, d'analyser les échantillons prélevés sur place, dans la parcelle. Dans le cadre de l'analyse du développement d'une LAMP ciblant le gène *egl* (endoglucanase) pour la détection de *Rastonia solanacearum*, l'extraction d'ADN a été faite à partir d'exsudats prélevés sur des plants de tomate ou dans des tubercules de pommes de terre infectés (Lenarcic *et al.*, 2014). Les échantillons ont été suspendus dans 100 µl d'eau stérile et incubés à 95°C pendant 5 min et 2 min, respectivement. Les résultats de cette étude ont permis de vérifier la portabilité de la LAMP sur les sites de production de pommes de terre.

Concernant *Psa*, un état des lieux des différents outils de détection par PCR est présenté dans le tableau 4-1.

❖ PCR en point final

La première PCR fut développée par Koh et Nou (Koh & Nou, 2002). Avec une approche Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), ils ont identifié un couple

Référence	Nom des Primers Taille amplicon	Locus ciblé	Strain detection	Type de PCR
Koh & Nou, 2002	KNR/KNF 492 bp	ompP1	<i>Psa</i>	C
Rees-George <i>et al.</i> , 2010	F1/R2 280 bp	ITS ADNr16S	<i>Psa</i> , <i>P. syringae</i> pv. theae	C
Gallelli <i>et al.</i> , 2011	KNR/KNF 492 bp	ompP1	<i>Psa</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> et pv. theae	C
	avrDF/avrDR 226 bp	effector <i>avrD</i>	<i>Psa</i> b1 et b3	
Liu <i>et al.</i> , 2012	SCARF7'/R7' 994 bp	?	<i>Psa</i> b3 from China	C
Balestra <i>et al.</i> , 2013	PsaF/PsaR 311 bp	hopZ3	<i>Psa</i> b1 b2 b3	C
	EuropeF/EuropeR 733 bp	ilot génomique PPHGI-1-like spécifique de <i>Psa</i> Europe	<i>Psa</i> b3 b1 (Italy)	
	J/K F / J/KR 254 bp	ilot génomique PPHGI-1-like séécifique de <i>Psa</i> Japon/Corée	<i>Psa</i> b1 (Japan) et b2	
	ChinaF/ChinaR 609 bp	ilot génomique PPHGI-1-like spécifique de <i>Psa</i> Chine	<i>Psa</i> b3	
Biondi <i>et al.</i> , 2013	B1/B2 631 bp	ompP1	<i>Psa</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> et pv. theae	C
	B1/B2 and KNF/KNR 502 bp	ompP1	<i>Psa</i> b1 b3	nested
Gallelli <i>et al.</i> , 2013	P3F/P5R1 147 bp	Effecteur <i>hrpw</i>	<i>Psa</i> b3	RT-PCR
	P0F/P6R 243 bp	Effecteur <i>hrpw</i>	<i>Psa</i> b3	C

Tableau 4-1 Tableau bilan récapitulatif des PCRs développées dans le cadre de la détection de *Psa*.

?: gène ciblé inconnu; C: PCR conventionnelle, RT-PCR: PCR en temps réel.

d'amorces (KNR/KNF) générant un fragment de 492 pb, correspondant à une partie de la séquence d'un gène de protéine extra-membranaire *omP1*, spécifique de *Psa* biovar 1 et 2. Puis Rees-Georges *et al.* développèrent une PCR avec un couple d'amorces F1/R2, ciblant l'ITS (Intergenic Transcription Space) des ADN ribosomiaux 16S et 23S de *Psa*, produisant un produit d'amplification de 280 pb (Rees-George *et al.*, 2010). Mais ces deux PCR présentaient des problèmes de spécificité, toutes deux généraient un signal positif avec *P. syringae* pv. *theae*, et celle de Koh et Nou croisait également avec *P. syringae* pv. *syringae* et *P. syringae* pv. *tomato*. Puis en 2011, Gallelli *et al.* proposèrent une PCR duplex en reprenant le couple d'amorces proposé par Koh et Nou et en développant un autre couple AvrDdpx-F/AvrDdpx-R, qui cible le gène effecteur *avrD* spécifique de *Psa* biovars 1 et 3. Cette PCR ne présente pas de problème de spécificité mais ne cible que *Psa* biovars 1 et 3, l'effecteur *avrD* étant absent chez les biovars 2 et 4.

Avec l'expansion de l'épidémie de *Psa* biovar3, des connaissances génomiques supplémentaires ont rapidement été disponibles. Ceci a favorisé le développement d'autres méthodes de détection par PCR ciblant spécifiquement les souches en fonction de leur appartenance à un biovar ou selon leur origine géographique (Liu *et al.*, 2012, Balestra *et al.*, 2013, Biondi *et al.*, 2013, Gallelli *et al.*, 2014).

❖ PCR temps réel

Une PCR temps réel a été développée et permet de cibler les souches de *Psa* biovar 3. Le suivi en temps réel se fait en utilisant le SYBER Green I (Gallelli *et al.*, 2014). Dans le cadre d'un projet EUPHRESKO, un essai inter-laboratoire a été conduit par le LSV d'Angers dans le but de comparer la performance d'outils de détection de *Psa* par PCR, en faisant intervenir des laboratoires internationaux (Australie, Espagne, France, Grèce, Italie, Portugal, Nouvelle-Zélande et Turquie). Cet essai révéla que parmi les nouvelles méthodes PCR il convient d'utiliser de préférence la PCR temps réel qui est la plus spécifique et présente le seuil de détection de le plus bas (1.10^4 UFC/mL) (Loreti, 2015).

❖ LAMP

Concernant la LAMP, deux LAMP sont en cours de développement. La première qui cible *Psa* biovar 3 permettrait d'avoir un résultat au bout de 30 min, et l'autre cible les trois biovars de *Psa* et aurait un seuil de détection de 10^3 UFC/mL (Ruinelli, 2015, Buriani, 2015).

Pays	Année de détection	A	B	C	D	E	F	G	H
Japon	1989	Psa1	cts haplotype A	Psa biovar 1		J-Psa	Korean/Japanese lineage		Psa J
Italie	1994	Psa1	cts haplotype A	Psa biovar 1		I-Psa	Korean/Japanese lineage		Psa I
Corée	1994	Psa2	cts haplotype A	Psa biovar 2			Korean/Japanese lineage		Psa K
Italie	2008	Psa3	cts haplotype I	Psa biovar 3		I2-Psa	European/Chinese lineage		Psa V
NZ	2011	Psa3		Psa biovar 3	Psa V		European/Chinese lineage		Psa V
NZ	2011	Psa4		Psa biovar 4	Psa LV			PsD, PsHa	Psa LV
Chili	2012	Psa3		Psa biovar 3					Psa V
Chine	2011	Psa3		Psa biovar 3			European/Chinese lineage		Psa V
Australie	2011	Psa4		Psa biovar 4					

Tableau 4-2 Noms utilisés pour nommer les souches de *Psa* depuis 2010.

A: Chapman *et al.*, 2012; B: Vanneste *et al.*, 2010; C: Vanneste *et al.*, 2013b; D: Kiwifruit Vine Health (<http://www.kvh.org.nz/>); E: Marcelletti *et al.*, 2011; F: Mazzaglia *et al.*, 2012; G: Butler *et al.*, 2013; H: McCann *et al.*, 2013.

4.1.3. Caractérisation des critères de performance d'un outil en vue de sa validation

Lorsque qu'un nouvel outil de détection est développé et que les conditions d'utilisation ont été optimisées, il est recommandé d'en évaluer la performance. Différents critères sont décrits, tels que : la sensibilité, la spécificité, le seuil de détection et la répétabilité.

La sensibilité correspond à la capacité d'une méthode à détecter un organisme cible dans un matériel végétal contaminé.

La spécificité, quant à elle, correspond à la capacité d'une méthode à distinguer un organisme cible d'un organisme non cible. Elle se distingue selon deux critères : l'inclusivité (capacité de la méthode de détecter la souche cible à partir d'un large panel de souches) et l'exclusivité (absence d'interférence avec des souches non cibles pour la méthode).

Le seuil de détection correspond à la plus petite quantité de l'organisme cible qui peut être détectée de manière répétable et reproductible.

La répétabilité d'une méthode peut-être évaluée au niveau intra-laboratoire en analysant un échantillon en duplicat, triplicat,... et au niveau inter-laboratoire lors d'EILV (Essais Inter Laboratoires de Validation). Ces essais permettent également de vérifier la portabilité de la méthode au sein d'un autre laboratoire.

La caractérisation des critères de performance des méthodes en vue de leur validation est définie dans des référentiels comme l'European Standard EN ISO 16140 :2003 (<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:16140:ed-1:v1:en>) et le standard PM7/98 proposés par l'OEPP (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epp.12118/pdf>).

4.2. Diversité génétique et études épidémiologiques de *Psa*

4.2.1. Historique des épidémies de *Psa*

Différentes souches de *Psa* ont été isolées depuis les années 1980 à ce jour dans différents pays producteurs de kiwi. Ci-après est présenté un historique structuré des différentes épidémies selon la caractérisation biologique des souches distinguées en biovars (voir partie 3.2.1.) (Vanneste *et al.*, 2013). Il faut néanmoins noter que différents termes ont été utilisés dans la littérature pour nommer les souches de *Psa* (Tableau 4-2), mais tout au long du manuscrit nous utiliserons le terme biovar.

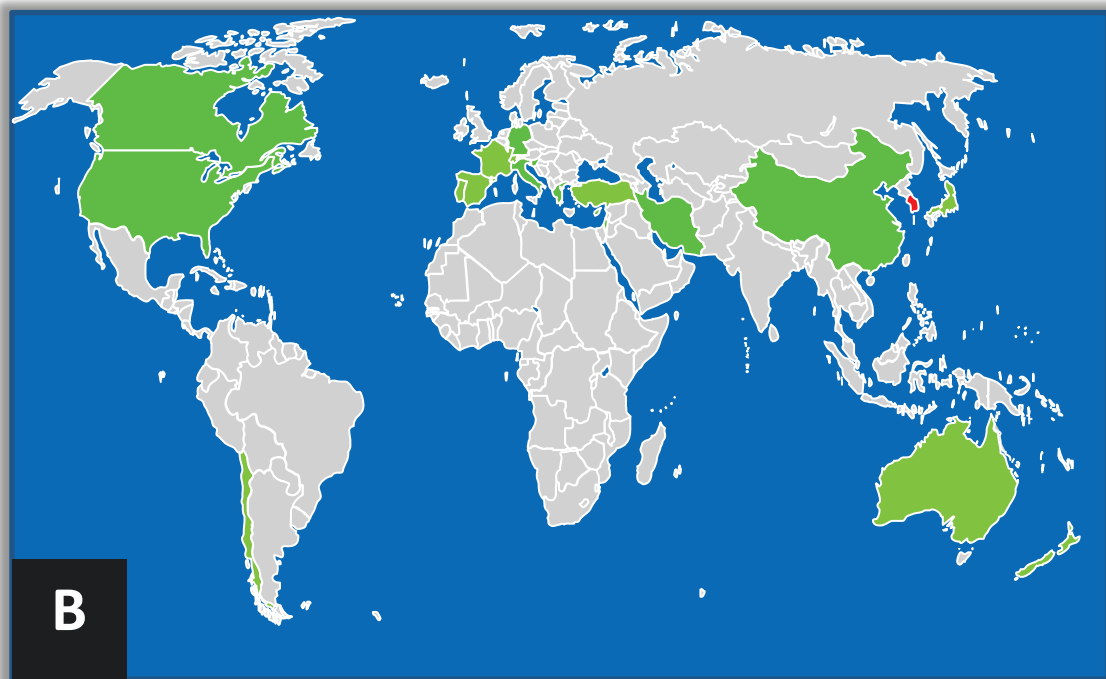
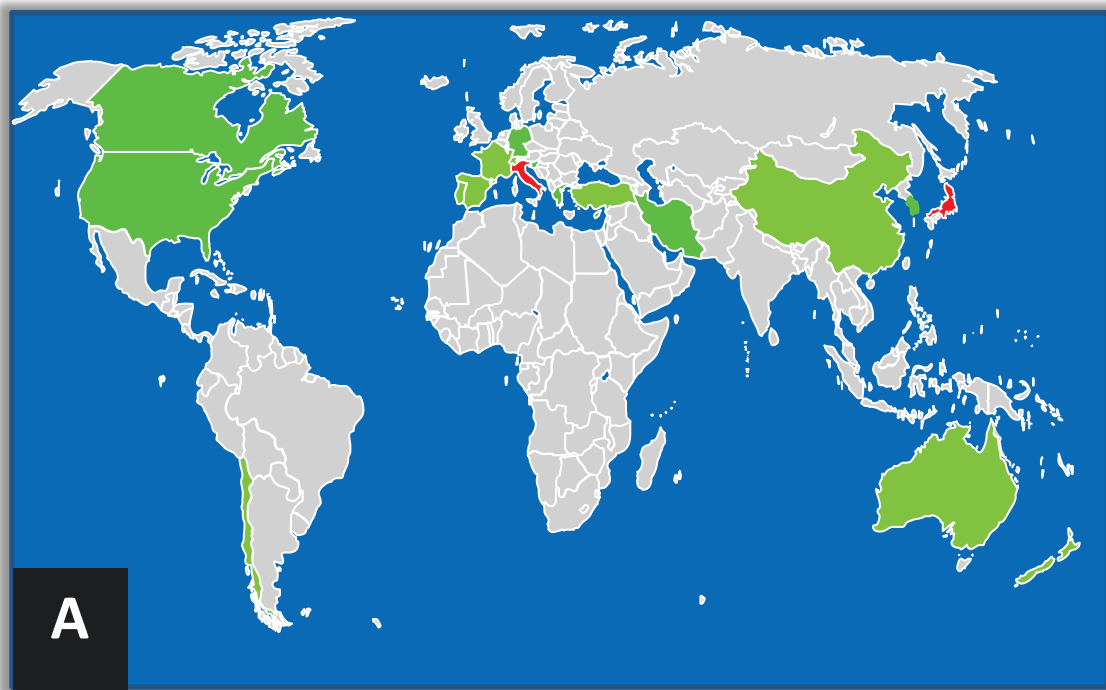


Figure 4-3 Cartes représentant les pays producteurs de kiwi touchés par *Psa* au niveau mondial.

En vert les pays producteurs de kiwi et en rouge les pays touchés par *Psa*; A: épidémie de *Psa* biovar 1; B: épidémie de *Psa* biovar 2.

a. Première épidémie : *Psa biovar 1*

C'est en 1984 que Serizawa et collègues (Serizawa *et al.*, 1989) ont isolé des souches sur une variété commerciale d'*A. chinensis* provoquant des symptômes similaires à *P. syringae*, responsable de chancre bactérien du kiwi isolé sur *A. chinensis* en Californie en 1980 (Opgenorth *et al.*, 1983). Mais les souches se différenciaient de celles isolées aux Etats-Unis au niveau de leur agressivité (elles causaient de plus sévères dégâts dans les vergers) et au niveau phénotypique (INA⁻, pas de production de pigments fluorescents, pas de capacité à liquéfier la gélatine). Ces souches, plus finement caractérisées avec des tests phénotypiques et pathogéniques, ont été assignées à un nouveau pathovar, le pathovar *actinidiae*, par Takikawa et collègues en 1989. En 1989, *Psa* a été isolé sur *A. arguta* et *A. kolokmita*, des espèces sauvages endémiques du Japon et pourraient représenter la source d'inoculum primaire de *Psa* pour *A. chinensis* au Japon (Ushiyama *et al.*, 1992a - 1992b).

En 1989, des souches isolées dans la région de Sichuan en Chine présentaient les mêmes caractéristiques morphologiques, pathogéniques, biochimiques et sérologiques que les souches isolées au Japon (Wang *et al.*, 1992). Mais ces informations restent à être confirmées, et à ce jour ces souches n'ont jamais été incluses dans les diverses études conduites sur *Psa*.

Puis en 1994, *Psa biovar 1* a été détecté en Italie sur *A. deliciosa* (Scortichini, 1994). La maladie a causé de sévères dégâts sur des jeunes plants et il semble que l'infection de plants plus âgés soit la résultante de la dissémination de la bactérie. La maladie aurait été introduite en Italie *via* du matériel végétal infecté.

En conclusion, les souches regroupées au sein du biovar 1 ont été isolées au Japon et en Italie dans les années 1980 et 1990 (Figure 4-3A). Depuis, aucune autre épidémie relative à ce biovar n'a été recensée à nouveau au Japon, en Italie, ou dans tout autre pays.

b. Deuxième épidémie : *Psa biovar 2*

Les souches regroupées au sein du biovar 2 ont uniquement été isolées en Corée du sud. La maladie a été identifiée en 1991 mais il semblerait que des foyers aient été observés depuis la fin des années 1980. La maladie a causé de sévères dégâts sur la côte sud-ouest de la Corée du sud (Koh *et al.*, 1994). La possibilité que la maladie ait été introduite du Japon existe, mais la voie d'introduction reste inconnue.

Aucune autre souche de *Psa biovar 2* n'a été isolée en dehors de la Corée du sud à ce jour (Figure 4-3B).

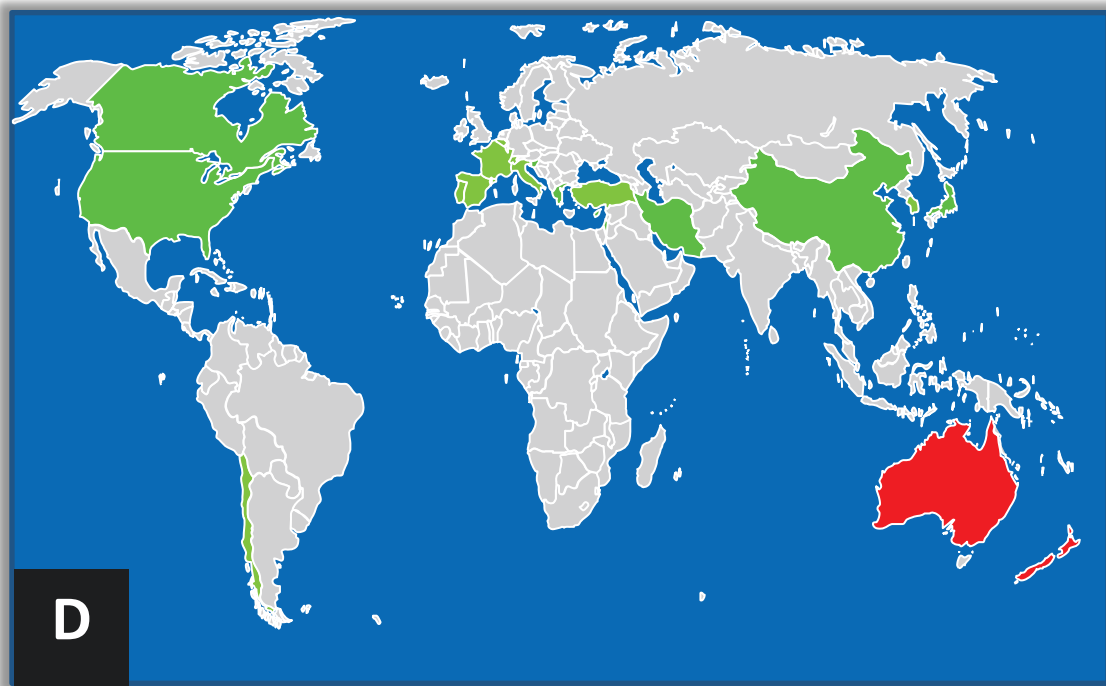
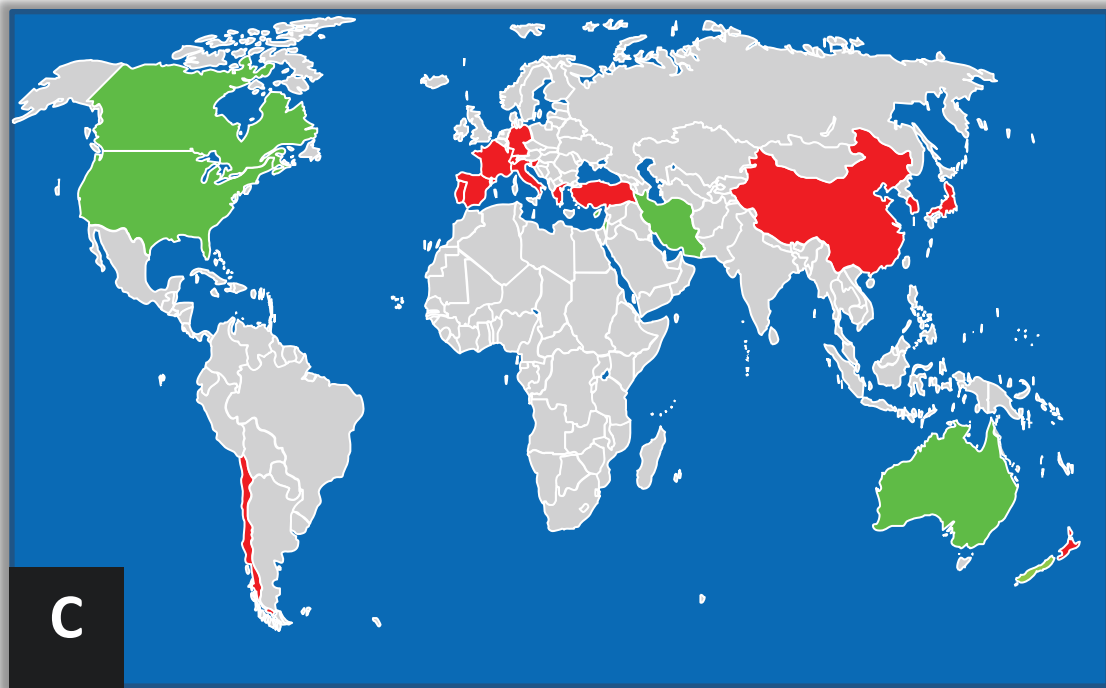


Figure 4-3 (suite) Cartes représentant les pays producteurs de kiwi touchés par *Psa* au niveau mondial. En vert les pays producteurs de kiwi et en rouge les pays touchés par *Psa*; C: épidémie de *Psa* biovar 3; D: épidémie de *Psa* biovar 4.

c. Troisième épidémie qualifiée de pandémie: *Psa* biovar 3

Psa biovar 3 a été détecté pour la première fois en Italie en 2008 sur *A. chinensis* cv. 'Hort16A' (Balestra *et al.*, 2009, Ferrante & Scortichini, 2009). Même si l'épidémie a ensuite rapidement affecté les vergers d'*A. deliciosa*, les vergers d'*A. chinensis* restent les plus impactés (Ferrante & Scortichini, 2009). L'année suivante la Turquie était touchée. En 2010, *Psa* biovar 3 fut détectée en Nouvelle-Zélande (île du nord), au Portugal, en France, au Chili et en Chine (Everett *et al.*, 2011, Balestra *et al.*, 2010b, Vanneste *et al.*, 2011b, EPPO, 2011a, Mazzaglia *et al.*, 2012), puis en 2011 en Espagne, en Suisse et en Corée du sud (Abelleira *et al.*, 2012, EPPO, 2011b, Koh *et al.*, 2012b). Plus récemment, *Psa* biovar 3 fut isolé en 2013 en Slovénie et en Allemagne (Dreo *et al.*, 2014, EPPO, 2013) (j'ai réalisé la phylogénie par MLSA et participé à la rédaction de la publication de Dreo *et al.*, 2014), en 2014 en Grèce (Holeva *et al.*, 2015) et en 2015 au Japon (Takikawa, 2015).

L'épidémie, due au biovar 3, diffère des deux premières par la sévérité des dégâts observés dans les vergers et par sa vitesse de propagation à travers la majorité des pays producteurs de kiwis. On ne parle d'ailleurs plus d'épidémie mais de pandémie (Scortichini *et al.*, 2012) (Figure 4-3C).

Depuis 20 ans, *A. chinensis* a été introduit dans les programmes de sélection. De ce fait, de nombreuses importations de matériel de propagation d'*A. chinensis* ont été effectués de la Chine vers l'Italie ou la Nouvelle-Zélande, deux pays gros producteurs de plants de kiwi. *A. chinensis* est suspecté d'être la source de la dissémination de *Psa* biovar 3 à travers le monde (Mazzaglia *et al.*, 2012). *A. chinensis* cv. 'Hort16A' a été créé et commercialisé dans les années 1990 en Nouvelle-Zélande puis exporté en Chine, en Italie, au Chili et en France. Ce cultivar est très sensible à *Psa* et la culture importante de ce cultivar dans certains pays comme l'Italie et la Nouvelle-Zélande a favorisé la propagation de *Psa* biovar 3.

Les pays producteurs les plus touchés sont l'Italie et la Nouvelle-Zélande. En 2008, les pertes économiques en Italie s'élevaient à 2 millions d'euros (Balestra *et al.*, 2009). En Nouvelle-Zélande, les pertes liées à la maladie s'élevaient à 126 millions de NZ-dollars en 2012 et de 500 à 600 millions de NZ-dollars dans les 5 prochaines années, et qu'en moyenne de 2012 à 2016 360 à 470 emplois en lien avec la filière seraient supprimés (Greer, 2012). Des informations sur la dispersion de la maladie, les avancées scientifiques et les méthodes de lutte en Nouvelle-Zélande et en Italie peuvent être trouvées sur les sites internet suivant: <http://www.kvh.org.nz>. et <http://www.freshplaza.it>.

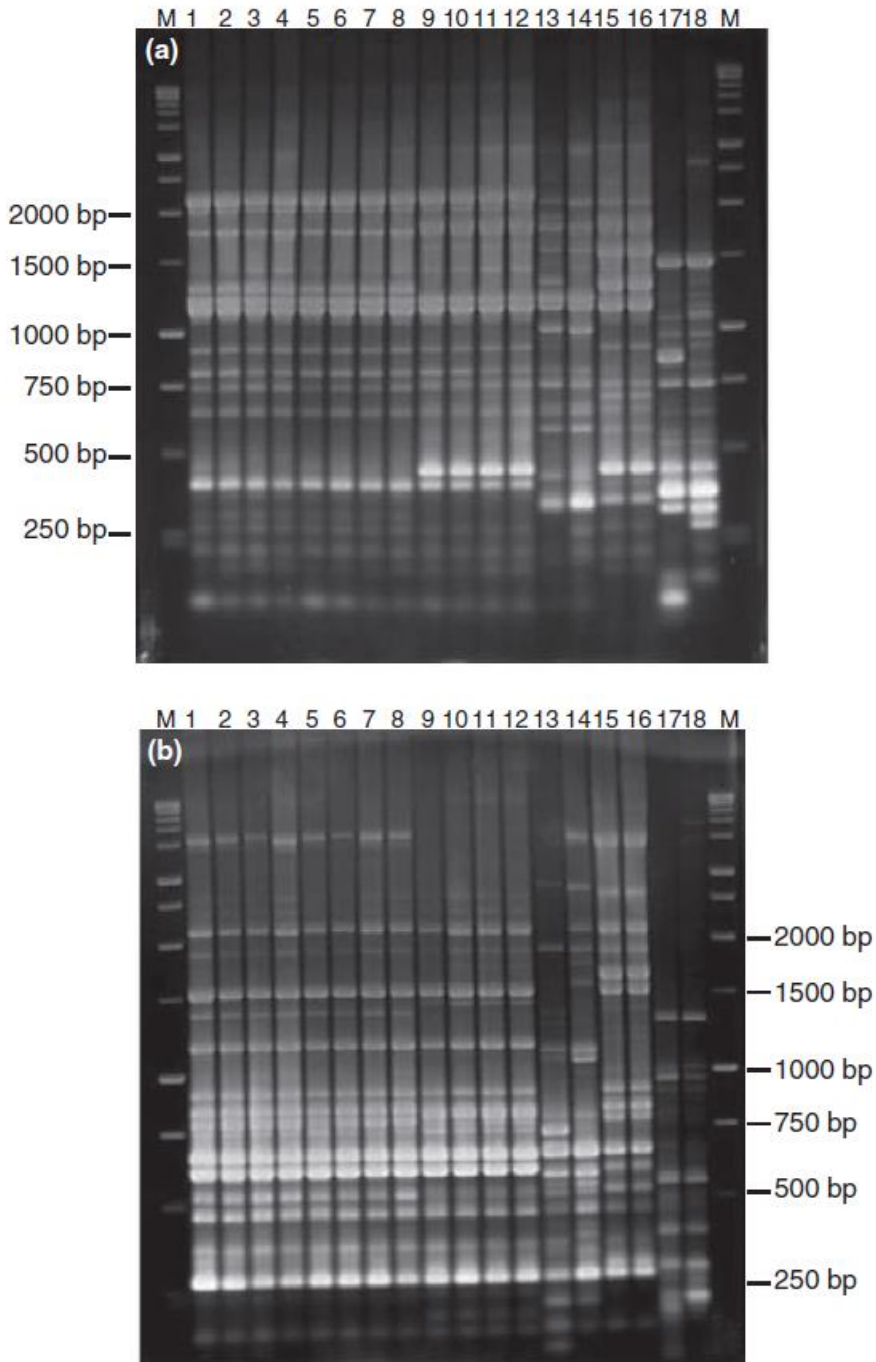


Figure 4-4 Photos de gels d'agarose des résultats d'amplifications de souches de *Psa* avec les méthodes de BOX-PCR et d'ERIC-PCR.

a: BOX-PCR; b: ERIC-PCR; puits 1 à 8: *Psa* biovar 3 isolées en Italie en 2008 et 2009; puits 9 à 10: *Psa* biovar 1 isolées au Japon; puits 11 à 12: *Psa* biovar 1 isolées en Italie; puits 13 à 14: *Pseudomonas avellanae*; puits 15 à 16: *Pseudomonas syringae* pv. *theae*; puits 17 à 18: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

D'après Ferrante & Scortichini, 2010.

d. Quatrième épidémie : *Psa* biovar 4

Les bactéries regroupées au sein du biovar 4 diffèrent de celles appartenant aux trois autres biovars de par les symptômes qu'elles génèrent. Elles ne causent pas de chancre sur bois mais seulement des symptômes sur feuilles. Ces souches ont été isolées en Nouvelle-Zélande (îles du nord et du sud) en 2010 et en Australie en 2011 (Vanneste *et al.*, 2013, EPPO, 2011c) (Figure 4-3D).

4.2.2. Etude de la diversité des souches de *Psa* par des techniques basées sur la PCR

Il existe différentes techniques utilisant la PCR, qui permettent de révéler de la diversité entre des souches au niveau intra espèces ou intra pathovars.

Des méthodes d'empreintes moléculaires basées sur la restriction du génome entier, telles que la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ou l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ou bien basées sur l'amplification aléatoire du génome avec des primers dessinés de façon arbitraire et de petite taille (9 à 10 bases), telle que la RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), permettent de révéler de la diversité. Ces techniques ont déjà été appliquées à différents pathovars de *P. syringae* (Manceau & Horvais, 1997, Clerc *et al.*, 1998) mais pas à *Psa*. D'autres méthodes d'empreintes moléculaires se basent sur la présence au sein du génome de séquences répétitives appelées rep, d'où le nom de la méthode la rep-PCR. Parmi la rep-PCR on distingue trois techniques qui ciblent différentes séquences répétitives : REP (REP-PCR), ERIC (ERIC-PCR) et BOX (BOX-PCR) (Versalovic *et al.*, 1991, Louws *et al.*, 1994). Ces trois techniques permettent d'obtenir des profils de bandes qui vont être spécifiques aux souches testées et l'exploitation de la distance mesurée entre les bandes permet la construction d'un arbre phylogénétique. L'ERIC-PCR et la BOX-PCR furent utilisées lors des premières caractérisations génétiques des souches de *Psa* (Figure 4-4) (Ferrante & Scortichini, 2010). L'inconvénient de ces méthodes d'empreintes moléculaire par rep-PCR réside dans la reproductibilité des résultats.

Une autre méthode, plus reproductible que celles présentées ci-avant, exploite le polymorphisme de séquence de gènes de ménage. Les gènes de ménage appartiennent au génome noyau ou « core genome » et sont très conservés dans les génomes bactériens. Néanmoins, ils permettent de distinguer les souches au niveau intra pathovar et sont très utiles dans les analyses de taxonomie bactérienne. L'analyse de concaténats de séquences de

Biovar	Pays d'isolement	Nombre de génomes	Taille moyenne en Mb	GC% moyen	Référence
1	Japon	12	6,1	58,60	A B C D E
	Italie	1	5,9	58,80	A
2	Corée	3	6	58,80	D
3	Italie	4	6,1	58,4	A B C D
	Nouvelle-Zélande	9	6,2	58,5	C D
	Chine	3	6,2	58,4	B C
	Chili	2	6,2	58,5	C
4	Nouvelle-Zélande	12	6,1	58,5	C D

Tableau 4-3 Liste des génomes de souches de *Psa* séquencés et déposés sur GenBank.

A: Marcelletti *et al.*, 2011; B: Mazzaglia *et al.*, 2012; C: Butler *et al.*, 2013; D: McCann *et al.*, 2013; E: Baltrus *et al.*, 2011.

	Biovar 1		Biovar 2			Biovar 3			
	KW41	PA459	KN2	CH2010-5	CH2010-6	346	CFBP 7285	CFBP 7286	CFBP 7287
KW41	0								
PA459	161	0							
KN2	154	159	0						
CH2010-5	7460	7464	7465	0					
CH2010-6	7460	7464	7465	0	0				
346	7456	7460	7461	6	6	0			
CFBP 7285	7457	7461	7462	7	7	6	0		
CFBP 7286	7457	7461	7462	7	7	6	1	0	
CFBP 7287	7457	7461	7462	7	7	6	1	1	0

Tableau 4-4 Nombre de SNPs distincts identifiés sur un total de 3 453 192 pb, par comparaison de 9 souches de *Psa* deux à deux.

Souches isolées au Japon, (en bleu), en Corée (en rouge), en Chine (en vert), au Portugal (en noir) et en Italie (en violet).

Adapté de Mazzaglia *et al.*, 2012.

plusieurs gènes de ménage par MLSA (Multilocus Sequence Analysis) permet de construire des arbres phylogénétiques et de positionner les souches les unes par rapport aux autres selon leurs liens de parenté. La MLST (Multilocus Sequence Typing) diffère de la MLSA par le fait qu'à chaque souche est apparenté un ST (Sequence Type), qui correspond à un génotype ou allèle donné. En général le nombre moyen de gènes de ménages utilisé est de sept, mais il peut varier d'un modèle d'étude à un autre. Comme présenté dans la partie 3.1.3, la MLSA et la MLST ont été utilisés pour révéler la diversité des souches de *Psa* en identifiant quatre clusters, correspondants aux quatre biovars.

4.2.3. Recherche de l'origine de l'épidémie par génomique comparative

Le premier génome de *Psa* (souche M302091 biovar 1 isolée au Japon en 1984) fut séquencé en 2008 dans le cadre d'une étude menée sur les *P. syringae* (Baltrus *et al.*, 2011). Suite à l'arrivée de la souche très agressive de *Psa* biovar 3, et la menace qu'elle représentait à l'échelle mondiale, les projets de génomique comparative se sont multipliés. A ce jour, les séquences génomiques de 46 souches de *Psa* (biovars 1 à 4) isolées dans différents pays sont disponibles sur NCBI (Tableau 4-3) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/185>). Toutes les souches de *Psa* ont une taille de génome similaire d'environ 6 Mb et un GC % compris entre 58,4 et 58,8%.

Comme révélé lors d'analyses phylogénétiques par MLSA et MLST, les analyses des génomes entiers confirment que les quatre biovars sont des lignées génétiques bien distinctes les unes des autres, et que les biovars 1, 2 et 3 sont plus proches de *P. syringae* pv. *theae* que du biovar 4 (Marcelletti *et al.*, 2011, Mazzaglia *et al.*, 2012, Butler *et al.*, 2013, McCann *et al.*, 2013). Les souches de *Psa* biovar 1 isolées en Italie et au Japon sont très similaires entre elles (97,5% de similarité nucléique et seulement 14 000 nt de différence) et similaires à 88,2% à une souche italienne de *Psa* biovar 3 (Marcelletti *et al.*, 2011). Mazzaglia *et al.* ont mis en évidence des différences de type SNPs entre les biovars 1, 2 et 3 (il n'y avait pas de biovar 4 dans leur étude) (Mazzaglia *et al.*, 2012). La recherche des SNPs a été réalisée à partir de la comparaison de reads de *Psa* avec la séquence du génome assemblé de *P. syringae* pv. *theae* NCPPB 2598. Sur 3 453 192 pb analysées, 7 625 SNPs sont polymorphiques entre les souches de *Psa*, et la majorité des SNPs différencient les biovars 1 et 2 du biovar 3 (Tableau 4-4).

McCann et collègues (McCann *et al.*, 2013) ont recherché des SNPs en utilisant comme séquence de référence le génome assemblé de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. Le biovar 4 a

4 000 SNPs de différence avec les autres biovars, alors que les biovars 1, 2 et 3 ne diffèrent entre eux que par 1 000 SNPs. Parmi les souches de *Psa* biovar 3 isolées durant la récente épidémie une souche chinoise (M228) se distingue des autres souches de *Psa* biovar 3 au niveau de la diversité évaluée sur SNPs (Butler *et al.*, 2013). McCann et collègues ont utilisé une souche *Psa* biovar 3 isolée en Nouvelle-Zélande comme référence pour ensuite rechercher des séquences homologues dans les séquences disponibles des autres souches de *Psa* biovar 3 isolées dans le reste du monde. Ils ont mis en évidence que 515 SNPs différenciaient la souche M228 des autres *Psa* biovar 3, alors qu'entre les autres souches le maximum de SNPs différents observés était de 52 (entre deux souches isolées en Italie). Cette analyse révèle un potentiel de diversité beaucoup plus important au sein des souches chinoises.

Les principaux objectifs de ces quatre études de génomique comparative étaient de comparer les génomes de *Psa* des différentes épidémies, d'identifier les gènes communs et différentiels en lien avec le pouvoir pathogène et de retracer l'origine de la récente épidémie de *Psa* biovar 3. C'est en Asie que se trouverait l'ancêtre commun de *Psa*. En 1992, Ushiyama *et al.* avaient déjà mis en avant cette hypothèse, des plants sauvages d'*Actinidia* représenteraient la source de *Psa* (Ushiyama *et al.*, 1992a).

L'importante similitude entre les génomes de souches de *Psa* biovar 1 isolées au Japon et en Italie supporte une origine commune pour ces souches (Marcelletti *et al.*, 2011). McCann et collègues (McCann *et al.*, 2013) ont montré, par le nombre important de SNPs et de gènes (une centaine) qui diffèrent entre *Psa* biovar 1 et 2, qu'il n'y a pas de lien direct entre ces deux épidémies. Elles correspondraient à deux événements d'introductions indépendants.

Pour Marcelletti et collègues (Marcelletti *et al.*, 2011), les souches de *Psa* biovar 3 ne dériveraient pas des souches de la première épidémie (*Psa* biovar 1) mais d'un ancêtre commun à ces deux biovars. Lorsqu'ils ont comparé les séquences ADN des gènes polymorphiques des souches de *Psa* biovars 1 et 3 avec les orthologues de ces gènes chez des souches appartenant au genomospécies 8 de *P. syringae* (*P. syringae* pv *theae* et *P. avellanae*), ils ont trouvé que même si *Psa* biovar 3 est plutôt similaire à *Psa* biovar 1, dans la plupart des cas *Psa* biovar 3 présente des résidus ancestraux communs aux autres souches du genomospécies 8. Ils ont statistiquement testé l'hypothèse que les deux biovars étaient généalogiquement monophylétiques, l'hypothèse a été rejetée par le test, ce qui renforce l'idée qu'il existe un ancêtre commun et que le biovar 3 ne dérive pas du biovar 1.

Mazzaglia et collègues ont ajouté des souches de *Psa* biovar 3 isolées en Chine dans leur analyse de génomique comparative et ont révélé qu'elle appartient à la même lignée génétique que les autres souches de cette récente épidémie (Mazzaglia *et al.*, 2012). Ils ont confirmé par une analyse SNPs que les souches de biovar 3 isolées en Italie ne proviennent pas des souches de biovar 1 isolées 16 ans auparavant, mais seraient issues d'un clone bien distinct introduit *via* du matériel de propagation d'*A. chinensis* infecté importé de Chine. Pour ces auteurs, les souches de *Psa* biovar 3 auraient aussi été introduites en Nouvelle-Zélande via du matériel de propagation d'*A. chinensis* infecté importé de Chine.

L'ancêtre commun des souches de *Psa* biovar 3 isolées en Italie et en Nouvelle-Zélande daterait de 10 à 15 ans, celui des souches de *Psa* biovar 3 isolées en Europe et en Chine daterait d'une douzaine d'années, et l'ancêtre commun des *Psa* biovars 1, 2 et 3 de 10 000 ans (Butler *et al.*, 2013, McCann *et al.*, 2013). Ces calculs ont été effectués en se basant sur l'exemple de l'épidémie de *P. syringae* pv. *aesculi* (agent pathogène responsable de chancre suintant du marronnier) pour laquelle le taux de mutation annuel a été estimé à 0,15–0,35 SNP/Mb/an (Green *et al.*, 2010). En moyenne 2,5 SNPs de différence ont été trouvés par Mb entre les souches de *Psa* biovar 3 isolées en Italie et en Nouvelle-Zélande, 3 SNPs de différence entre les souches de *Psa* biovar 3 isolées en Europe et en Chine, et 7000 SNPs de différence par Mb entre les souches de *Psa* biovar 1 (isolées au Japon), biovar 2 (isolées en Corée) et de *Psa* biovar 3 (isolées en Italie) (Butler *et al.*, 2013, Mazzaglia *et al.*, 2012).

Concernant les souches de *Psa* biovar 4, aucune information relative à leur origine ou leur voie d'introduction n'a été mise en évidence.

4.2.4. Retracer les routes des épidémies

La compréhension du mode d'invasion et de l'origine des agents épidémiques est primordiale pour mettre en place une surveillance performante et pour prévenir de nouvelles introductions.

La MLVA (Multilocus Variable number of tandem repeats Analysis) (Keim *et al.*, 2000) est une méthode de génotypage puissante qui permet de retracer les routes des épidémies et d'en identifier l'origine. L'objectif de la MLVA est de cibler par PCR des variations en nombre de répétitions en tandem (TRs) (de plus de cinq nucléotides), aussi appelées VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats), qui vont permettre de discriminer les souches entre elles et de révéler plus de variabilité que des méthodes comme la MLSA ou les rep-PCRs. On peut observer de la variabilité au sein des TRs, et parmi les motifs répétés

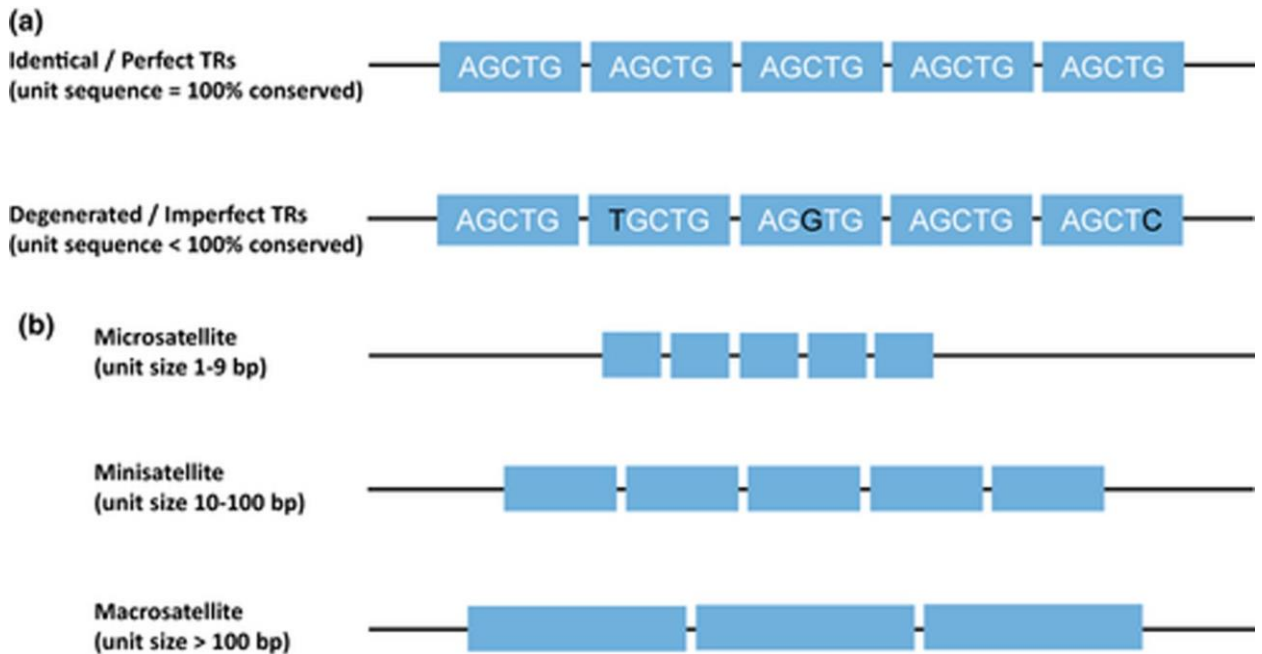


Figure 4-5 Représentation des différents types et catégories de TR.

a: comparaison de TRs présentant des répétitions identiques et de TRs présentant des imperfections; b: catégories des motifs répétés en fonction de leur taille.

D'après Zhou *et al.*, 2014.

on distingue les microsatellites (taille du motif répété inférieur à 9 nucléotides), les minisatellites (taille du motif répété comprise entre 10 et 100 nucléotides) et les macrosatellites (taille du motif répété comprise supérieure à 100 nucléotides) (Figure 4-5).

En général les VNTRs évoluent selon le modèle de mutation « pas à pas » (stepwise mutations) par gain ou perte d'une répétition, mais elle peut également impliquer un gain ou une perte de plusieurs répétitions par recombinaison entre les répétitions (Lindstedt, 2005, Elberse *et al.*, 2011, Vogler *et al.*, 2006). La vitesse d'évolution des microsatellites est plus rapide que celle des minisatellites (Zhou *et al.*, 2014). Une des difficultés que l'on peut rencontrer au cours de la MLVA est le phénomène d'homoplasie. L'homoplasie de taille correspond à une identité de taille de TRs entre deux haplotypes qui ne proviennent pas d'un ancêtre commun. Il est important d'avoir un set de VNTRs en nombre suffisant, polymorphes et ciblant des loci bien répartis sur le génome pour s'affranchir de biais apportés par les échanges génétiques horizontaux. La MLVA a été appliquée à l'étude épidémiologique de nombreuses bactéries pathogènes des plantes, listées dans le tableau 4-5.

Il est possible de combiner l'analyse de la structuration des populations par MLVA avec des méthodes statistiques sans *a priori* qui ne tiennent pas compte des modèles d'évolution, appelées analyses multivariées. Ces analyses multivariées vont permettre d'extraire une structure biologique à partir des résultats de l'analyse de marqueurs génétiques. On distingue l'ACP (Analyse en Composantes Principales (PCA en anglais) et l'Analyse Discriminante en Composantes Principales (DAPC en anglais). Le principe de ces méthodes est de résumer la variabilité génétique révélée par les marqueurs moléculaires sous forme de composantes principales qui vont être vectoriellement projetées dans un espace plus réduit qui maximise l'information résumée (Jombart *et al.*, 2009). L'ACP convient pour l'analyse de la structuration de populations non complexes dont les individus sont regroupés dans des sous-populations bien distinctes. L'objectif de l'ACP est de maximiser la variance entre les individus. La DAPC permet d'analyser des populations plus complexes. La DAPC identifie et décrit de manière optimum des clusters regroupant des individus génétiquement liés (Jombart *et al.*, 2010). L'objectif de la DAPC est de maximiser la variance entre les clusters de populations.

4.3. Réglementation de *Psa* en Europe et en France

Psa étant une maladie émergente des régions méditerranéennes, le Secrétariat de l'OEPP décida de l'enregistrer sur la liste d'alerte OEPP (Organisation Européenne pour la

Auteurs	Année	Nb de loci	Pathogène	Plante hôte
Della Coletta-Filho <i>et al.</i>	2001	8	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Citrus sinensis</i> ; <i>Coffea arabica</i>
Bui Thi Ngoc <i>et al.</i>	2009	14	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	<i>Citrus</i> spp.
Cesbron <i>et al.</i>	2014	26	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>celebensis</i> ; pv. <i>corylina</i> ; pv. <i>juglandis</i> ; pv. <i>fragariae</i> ; pv. <i>poinsetticola</i> ; pv. <i>populi</i> ; pv. <i>pruni</i> .	<i>Musa acuminata</i> ; <i>Corylus</i> spp.; <i>Juglans regia</i> ; <i>Fragaria</i> spp.; <i>Euphorbia pulcherrima</i> ; <i>Populus</i> spp.; <i>Prunus</i> spp..
Gironde & Manceau	2012	8	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> ; pv. <i>tomato</i>	<i>Brassicaceae</i> fam.; <i>Lycopersicon esculentum</i>
Zhao <i>et al.</i>	2012	25	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>orizicola</i>	<i>Oryza sativa</i>
N'Guessan <i>et al.</i>	2013	26	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Solanaceae</i> fam.
Zaluga <i>et al.</i>	2013	8	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Pruvost <i>et al.</i>	2014	31	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	<i>Citrus</i> spp.
Vernière <i>et al.</i>	2014	14	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	<i>Citrus</i> spp.
Bühlmann <i>et al.</i>	2014	6	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Pomaceae</i> fam.

Tableau 4-5 Recensement des études MLVA menées sur des bactéries pathogènes de plante.

Adapté de Ciarroni *et al.*, 2015.

Protection des Plantes) en novembre 2009. Puis fin 2012 *Psa* fut enregistré sur la liste A2 de l'OEPP et le Comité Permanent Phytosanitaire (CPP) de la Commission européenne vota en faveur d'une mesure d'urgence. La décision d'exécution 2012/756/UE de la Commission européenne cible les mesures à mettre en place pour éviter l'introduction et la propagation de la maladie dans l'Union Européenne (UE) (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:335:0049:0054:FR:PDF>). Un passeport phytosanitaire européen (PPE) est requis pour que le pollen vivant et les végétaux destinés à la plantation (sauf les semences) puissent circuler au sein de l'UE, et pour le matériel végétal en provenance de pays en dehors de l'UE un certificat phytosanitaire est requis.

Suite à la détection de *Psa* en France en 2010, un plan de surveillance national fut mis en place en 2011 par le Ministère de l'Agriculture afin d'appréhender le niveau de la contamination française et les espèces d'*Actinidia* touchées. Des agents du Service Régional de l'Alimentation (SRAL) et de la Fédération Régionale de Défense contre les Organismes Nuisibles (FREDON) prospectèrent des vergers et firent des prélèvements si nécessaire. Les échantillons symptomatiques étaient envoyés au LSV d'Angers qui les diagnostiquait. Ce plan de surveillance fut modifié en 2013, suite à la décision de la Commission européenne, et la surveillance fut étendue aux pépinières.

5. Objectifs de la thèse

Psa a été détecté en France en 2010 par le LSV d'Angers, qui a ensuite été en charge d'analyser les échantillons prélevés dans le cadre du plan de surveillance mis en place par le Ministère de l'Agriculture. En 2013, le nombre de souches de *Psa* isolées et mises en collection était de plus de 300 souches. L'objectif global de la thèse était de faire de l'étude de *Psa* un modèle analytique qui puisse être utilisé lors de nouvelles émergences de maladies bactériennes et qui puisse permettre d'affiner la réglementation et les mesures à prendre dans les vergers infectés.

Les axes de travail ont été au nombre de trois :

- le premier axe cible l'identification et la caractérisation des souches de *Psa* isolées en France en utilisant des tests phénotypiques et de pouvoir pathogène, et le développement d'une analyse MLSA pour définir la structure phylogénétique des souches responsables de dégâts sur kiwi. A partir de cette analyse phylogénétique et de la caractérisation va être proposée une nouvelle nomenclature permettant une gestion adaptée des épidémies.

- le deuxième axe correspond à retracer les routes d'invasion de *Psa* et d'identifier l'origine de l'épidémie en France en utilisant un outil de génotypage, la MLVA.

- le troisième axe vise à développer un outil de détection rapide ciblant indépendamment les quatre biovars et de tester la robustesse de cet outil sur une large collection de souches grâce à la plateforme de génotypage à haut-débit IdentityPath de l'Anses.

Chapitre II. Résultats

1. Deux bactéries pathogènes du kiwi identifiées en France

1.1. Résumé de l'article

1.1.1. Introduction

Des travaux conduits en 2012 par Chapman *et al.* (2012) et Vanneste *et al.* (2013) ont mis en évidence que les souches isolées durant les différentes épidémies de *Psa* se distinguaient au sein de quatre biovars. Cette distinction s'appuyait sur des tests phénotypiques et pathogéniques et une analyse phylogénétique.

La détection de *Psa* en France en 2010 a donné lieu à la mise en place d'un plan national de surveillance. De nombreux échantillons symptomatiques ont été analysés au sein du LSV d'Angers et les souches isolées ont été mises en collection. Début 2013 cette collection était constituée de 280 souches isolées dans les différentes régions productrices du kiwi.

L'objectif des premiers travaux de thèse, qui ont fait l'objet d'un premier article, était de caractériser et d'évaluer la diversité des souches au sein de cette collection.

1.1.2. Méthodologie

La caractérisation des 280 souches au niveau du pathovar et du biovar a été réalisée à l'aide de tests phénotypiques (LOPAT, hydrolyse de l'esculine, production de syringomycine, émission de fluorescence sur milieu B de King), moléculaires (PCR ciblant les gènes codant pour la coronatine et la phaséolotoxine), pathogéniques (inoculation par pulvérisation sur feuilles et par piqûre sur tige) et la diversité génétique des souches a été évaluée avec une méthode de rep-PCR, la BOX-PCR. .

Une étude phylogénétique a été conduite par MLSA à partir de l'analyse des séquences partielles de quatre gènes de ménage (*gapA*, *gltA*, *gyrB* et *rpoD*). Une sous-collection de 72 souches (50 *Psa* biovar 3 et 22 biovar 4) représentatives de la diversité observée au sein des 280 souches de départ, a été constituée en tenant compte de trois critères : l'hôte, la région et l'année d'isolement. La MLSA a été appliquée à cette sous-collection enrichie avec des souches des quatre biovars isolées dans différents pays et des souches de *P. syringae* représentatives des génomospecies tels que définis par Bull *et al.* (2011).

Un arbre de coalescence a été construit à partir des séquences utilisées pour la MLSA à l'aide du logiciel ClonalFrame afin d'étudier la généalogie clonale des souches de *Psa*.

1.1.3. Résultats et discussion

Les caractérisations phénotypique, moléculaire et pathogénique ont révélé la présence de deux biovars parmi les 280 souches isolées en France : 248 souches correspondent à *Psa* biovar 3 et 32 à *Psa* biovar 4. L'analyse de la diversité génétique des souches par BOX-PCR a révélé que les profils des souches de *Psa* biovar 3 isolées en France, en Nouvelle-Zélande et en Italie sont identiques. De même, les profils des souches de *Psa* biovar 4 isolées en France et en Nouvelle-Zélande étaient identiques, à l'exception d'une souche néo-zélandaise présentant des bandes supplémentaires.

L'étude phylogénétique par MLSA a confirmé la structuration des souches de *Psa* en quatre lignées distinctes les unes des autres correspondant aux quatre biovars, comme déjà démontré par Chapman *et al.* (2012). L'ajout des souches de *Psa* biovars 4 isolées en France a mis en évidence de la diversité au sein de ce biovar 4 qui se structure lui-même en quatre lignées différentes. De plus, *Psa* biovar 4 est phylogénétiquement éloigné des trois autres biovars qui sont plus proches de *P. syringae* pv. *theae*.

L'arbre de coalescence présentait la même structuration des biovars que la MLSA. La reconstruction de la généalogie clonale a révélé que l'ancêtre commun aux biovars 1, 2 et 3 est plus récent que celui des quatre lignées du biovar 4. Aucun ancêtre commun récent aux quatre biovars n'a été identifié, ce qui suggère que d'autres souches, non isolées à ce jour, sont impliquées dans l'évolution des souches de *P. syringae* associées au kiwi.

Il existe de nombreuses différences (phénotypiques et moléculaires) entre les quatre biovars de *Psa*, mais la plus importante se situe au niveau du pouvoir pathogène. Les souches du biovar 4 causent essentiellement des symptômes sur feuilles, à l'inverse des trois autres biovars qui peuvent également causer des chancres sur bois. C'est en s'appuyant sur la différence de pouvoir pathogène que nous avons proposé de renommer les souches de *Psa* biovar 4 en *P. syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov.

La présence de *P. syringae* pv. *actinidifoliorum* dans un verger n'engendre ni perte de rendement ni dégâts sur les plantes (les symptômes n'évoluant jamais en chancre). Les mesures prises sur le terrain pour limiter la propagation du chancre du kiwi n'étant pas différenciées selon le biovar (biovar 3 ou biovar 4) détecté, il était primordial de renommer le biovar 4 afin qu'il ne soit plus pris en compte de la même manière. Autrement dit, que ne

soient appliquées les mesures de gestion de lutte contre le chancre bactérien du kiwi quaux seuls verger contaminés par le pathovar responsable de la maladie, à savoir *P. s. pv. actinidiae* et non pas *P. s. pv. actinidifoliorum (Psaf)*.

1.1.4. Conclusion

Au-delà des informations relatives à la diversité des souches de *Psa* isolées en France, ce premier article a permis de renommer *Psa* biovar 4 en *P. syringae* pv. *actinidifoliorum* et d'apporter ainsi un élément clé pour faire évoluer de la réglementation de *Psa* au niveau national et international.

1.2. Publication

Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) isolated from France and assignment of Psa biovar 4 to a *de novo* pathovar: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov.

A. Cuntly^{abcde}, F. Poliakoff^d, C. Rivoal^d, S. Cesbron^{abc}, M. Fischer-Le Saux^{abc}, C. Lemaire^{abc}, M. A. Jacques^{abc}, C. Manceau^d and J. L. Vanneste^{e*}

^aINRA, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, Beaucozéz, F-49071, Beaucozéz; ^bUniversité d'Angers, UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, SFR 4207 QUASAV, F-49045; ^cAgroCampus-Ouest, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F-49045; ^dAgence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail – Anses – Laboratoire de la santé des végétaux, Angers, France and ^eThe New Zealand Institute for Plant & Food Research Ltd, Hamilton, New Zealand

Since 2008, bacterial canker of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* and *A. chinensis*) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) has resulted in severe economic losses worldwide. Four biovars of Psa can be distinguished based on their biochemical, pathogenicity and molecular characteristics. Using a range of biochemical, molecular and pathogenicity assays, strains collected in France since the beginning of the outbreak in 2010 were found to be genotypically and phenotypically diverse, and to belong to biovar 3 or biovar 4. This is the first time that strains of biovar 4 have been isolated outside New Zealand or Australia. A multilocus sequence analysis based on four housekeeping genes (*gapA*, *gltA*, *gyrB* and *rpoD*) was performed on 72 strains representative of the French outbreak. All the strains fell into two phylogenetic groups: one clonal corresponding to biovar 3, and the other corresponding to biovar 4. This second phylogenetic group was polymorphic and could be divided into four lineages. A clonal genealogy performed with a coalescent approach did not reveal any common ancestor for the 72 Psa strains. Strains of biovar 4 are substantially different from those of the other biovars: they are less aggressive and cause only leaf spots whereas Psa biovars 1, 2 and 3 also cause canker and shoot die-back. Because of these pathogenic differences, which were supported by phenotypic, genetic and phylogenetic differences, it is proposed that Psa biovar 4 be renamed *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov. Strain CFBP 8039 is designated as the pathotype strain.

Keywords: *Actinidia chinensis*, *Actinidia deliciosa*, bacterial canker of kiwifruit, multilocus sequence analysis, pathogenicity

Introduction

Outbreaks of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), the causal agent of bacterial canker of kiwifruit *Actinidia* spp., were first reported in Japan (1989), China (1992), Korea (1994) and Italy (1994) (Vanneste, 2013). More recent outbreaks in Italy (2009) and in other parts of Europe (2010), New Zealand (2010) and Chile (2010) are of greater economic importance than those previously documented (Vanneste, 2013).

Recently, strains of Psa isolated around the world over the last 30 years were grouped in four biovars based on biochemical, genetic and pathogenicity characteristics (Vanneste *et al.*, 2013). Multilocus sequence analysis (MLSA) and multilocus sequence typing (MLST) using housekeeping genes and effector gene sequences resulted

in a similar grouping (Chapman *et al.*, 2012) to that described by Vanneste *et al.* (2013). Strains of biovar 1 produce phaseolotoxin and were initially isolated from Japan and Italy before 2008; strains of biovar 2 produce coronatine but not phaseolotoxin; strains of biovar 3 produce neither coronatine nor phaseolotoxin and are responsible for the most recent outbreaks (including the Italian outbreak of 2008). Recent studies suggest that strains of Psa biovar 3, responsible for the current global outbreak, may have originated in China between 10 and a few dozen years ago (Mazzaglia *et al.*, 2012; Butler *et al.*, 2013; McCann *et al.*, 2013). Strains of biovar 4 produce neither coronatine nor phaseolotoxin and are less aggressive than strains of other biovars (Vanneste *et al.*, 2013). They cause fewer necrotic spots on leaves than strains of biovar 3 and do not cause canker or shoot die-back (Vanneste *et al.*, 2013). Strains belonging to biovar 4 were previously isolated in Australia and New Zealand (Vanneste *et al.*, 2013).

In France, Psa was detected for the first time in 2010 (Vanneste *et al.*, 2011). In 2011, the French Ministry of

*E-mail: Joel.Vanneste@plantandfood.co.nz

Agriculture requested a national survey to determine the area affected by Psa. This survey concerned first the orchards of *Actinidia chinensis*, then those of *Actinidia deliciosa* planted since 2006 with plants originating from Italy or New Zealand, and finally it was extended to all other orchards (Bourgouin & Fritsch, 2013). In 2012, the survey was extended to the nurseries and to a radius of 4 km around them. No extension of the epidemic was observed in 2012 (Bourgouin & Fritsch, 2013). However, the climatic conditions during spring 2013 favoured the spread of Psa and by the end of that year it was estimated that 10 to 15% of the orchards were affected (Bourgouin & Fritsch, 2013).

Psa has been registered by the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) in the A2 list of pests recommended for regulation as quarantine pests (http://www.uab.cat/Document/526/300/patogens_vegetals_quarantena_2012.pdf). In November 2012, the Commission of the European Union (EU) ordered surveys and measures to limit the propagation of Psa in the EU member states. Pollen and plants originating from countries outside the EU must be accompanied by a phytosanitary certificate, inspected and, when appropriate, tested for the presence of Psa. Within the EU, a plant passport is required to certify that the plants are coming from a Psa-free area, and plants may also be inspected and tested for the presence of Psa. Presence of any biovar of Psa on a plant, including Psa biovar 4, which induces only leaf spots and does not lead to any economic loss (Vanneste *et al.*, 2013), lead to this plant being considered contaminated by Psa, and therefore subjected to all legal control measures including destruction of the plant material.

The initial aim of this study was to characterize the populations of Psa isolated from kiwifruit in France. The diversity observed between the strains analysed led to studying their phylogeny. Two hundred and eighty strains of Psa isolated from *Actinidia* spp. were characterized based on phenotypical traits (biochemical tests and pathogenicity assays) and genomic data (BOX PCR profiles). A representative sample of 72 of the strains isolated in this study and strains representing the four biovars of Psa were used for a multilocus sequence analysis using four housekeeping genes and for a clonal genealogy study.

Materials and methods

Bacterial isolation

Two hundred and eighty strains of Psa were isolated from leaves, canes, flower buds and roots of *Actinidia* species (*A. deliciosa*, *A. chinensis* or *A. arguta*) from different regions in France during the surveys conducted from 2010 to June 2013 (Table S1). The bacterial strains used for the genetic characterization are listed in Table 1.

When Psa strains were isolated from a plant with symptoms, tissues taken from the margins of necrotic lesions were macerated in sterile water and incubated for 20 min at room tempera-

ture. Aliquots of 100 μ L were plated onto King's B medium supplemented with cycloheximide (0.018%) and boric acid (0.136%) (KBc-ba) and incubated at 25°C for 3 to 6 days. Psa-like colonies were purified twice on KBc-ba.

Bacterial characterization

Isolates were tested for cytochrome c oxidase activity using Test Oxydase (Pro-Lab Diagnostic), for production of levan on saccharose-rich medium, and for their ability to hydrolyse arginine and aesculin as described previously (Lelliott *et al.*, 1966). Production of a fluorescent pigment from bacterial colonies was observed on KBc-ba under ultraviolet light ($\lambda = 560$ nm). The potato test for presence of cell wall-degrading enzyme was performed as described by Vanneste *et al.* (2010). The hypersensitive response (HR) was monitored after injection of a bacterial suspension (10^8 colony-forming units (CFU) mL^{-1}) into tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* 'Xanthi') (Vanneste *et al.*, 2013). The production of syringomycin was assessed according to Vanneste *et al.* (2013).

The catabolic activity on 95 substrates of the French Psa strains CFBP 7906, CFBP 7908, CFBP 7910, CFBP 7951, CFBP 8043 and CFBP 8161 was determined using two Biolog GN MicroPlates (Biolog) per bacterial strain, according to the manufacturer's instructions, with bacterial suspensions calibrated at an optical density (OD 600 nm) of 0.2 and 0.5. The colour changes were measured at 590 nm using a microplate spectrophotometer (μ Quant, Bio-Tek) after 5 days of incubation at 24°C and the resulting data were corrected using the no-substrate control. The threshold value for a positive result was OD ≥ 0.350 at 590 nm. The ice nucleation activity (INA) of these six strains was determined according to Lindow *et al.* (1978); *P. syringae* pv. *syringae* CFBP 4702 and *P. syringae* pv. *tomato* CFBP 2212 were used as a positive and a negative control respectively. The motility of these strains was assessed on Moka medium (yeast extract 4 g, casamino acids 8 g, KH_2PO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, Bacto agar 0.2% per litre) supplemented with 0.05% of 2-3-5 triphenyl tetrazolium chloride to follow the movement of the bacteria. A drop of 10 μ L of a bacterial suspension (10^8 CFU mL^{-1}) was deposited on the centre of a Petri dish.

For molecular characterization, total DNA was extracted by boiling bacterial suspensions (10^6 CFU mL^{-1}) for 15 min, followed by a 10-min centrifugation at 10 000 g at 4°C. Three sets of primers (PsaF1/R2, Rees-George *et al.*, 2010; KN-F/KN-R, Koh & Nou, 2002; AvrDdpx-F/AvrDdpx-R, Gallelli *et al.*, 2011), yielding 280, 492 and 226 bp amplicons, respectively, were used to identify strains of Psa. The presence of the genes necessary for production of the toxin coronatine (*Cfl*) and of phaseolotoxin (*argK*) was determined using the primers CFLF/CFLR (Bereswill *et al.*, 1994) and ArgKF3/ArgKR (Templeton *et al.*, 2005), which yield 665 bp and 800 bp amplicons, respectively. BOX PCR was performed following the protocol published by Louws *et al.* (1994). The sequences of the primers used in this study are presented in Table S2. All PCR was conducted with a Veriti 96-well thermal cycler (Applied Biosystems). PCR products were separated by horizontal gel electrophoresis by loading 15 μ L of the reaction in a 1.5% agarose gel in $1 \times$ TBE buffer and staining with ethidium bromide (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The DNA bands were visualized with Gel Doc XR+ BioradImager (Bio-Rad). To estimate the size of the amplicons, the 100 bp DNA molecular weight marker XIV (Roche Applied Science) was used. For the BOX PCR, the 1 kb Plus DNA ladder from Invitrogen was used.

Table 1 Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* used in this study

Strain name	Host	Sample	Year of isolation	Country of isolation	Region of isolation	Fluorescence on KB ^a	Aesculin ^b	avrD7 ^c	Biovar	Reference
CFBP 4909 ^{PT1}	<i>Actinidia deliciosa</i>	Leaf/Wood	1984	Japan	Shizuoka	-	-	+	1	Takikawa et al. (1989), Ferrante & Scottichini (2010)
ICMP 9617	<i>A. deliciosa</i>	Leaf/Wood	2008	Italy	Lazio	-	-	+	3	Balestra et al. (2009), Vanneste et al. (2013)
CFBP 7287	<i>A. deliciosa</i>	Leaf/Wood	2010	New Zealand	Hawke's Bay	-	-	+	3	Vanneste et al. (2013)
CFBP 7811/10627 ^d	<i>Actinidia chinensis</i>	Wood	2010	New Zealand	Hawke's Bay	-	-	+	4	Vanneste et al. (2013)
CFBP 7812/	<i>A. chinensis</i>	Leaf	2010	New Zealand	Motueka	+	+	-	4	Vanneste et al. (2013)
ICMP 19098	<i>A. chinensis</i>	Leaf	2010	New Zealand	Hawke's Bay	+	+	-	4	Chapman et al. (2012), this study
CFBP 7901/	<i>A. chinensis</i>	Leaf	2010	New Zealand	Hawke's Bay	+	+	-	4	Chapman et al. (2012), this study
ICMP 18803	<i>A. chinensis</i>	Leaf	2010	New Zealand	Bay of Plenty	+	+	-	4	Chapman et al. (2012), this study
CFBP 7902/	<i>A. chinensis</i>	Leaf	2010	New Zealand	Bay of Plenty	+	+	-	4	Chapman et al. (2012), this study
ICMP 18804	<i>A. chinensis</i>	Leaf	2010	New Zealand	Nelson	+	+	-	4	Chapman et al. (2012), this study
CFBP 7903/	<i>A. chinensis</i>	Leaf	2010	New Zealand	Nelson	+	+	-	4	Chapman et al. (2012), this study
ICMP 18882	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2010	New Zealand	Nelson	+	+	-	4	Chapman et al. (2012), this study
CFBP 7904/	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2010	New Zealand	Nelson	+	+	-	4	Chapman et al. (2012), this study
ICMP 18883	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2010	New Zealand	Nelson	+	+	-	4	Chapman et al. (2012), this study
CFBP 7905/	<i>A. chinensis</i>	Leaf	2010	New Zealand	Bay of Plenty	+	+	-	4	Chapman et al. (2012), this study
ICMP 19074	<i>A. chinensis</i>	Leaf	2010	New Zealand	Bay of Plenty	+	+	-	4	Chapman et al. (2012), this study
CFBP 7906	<i>A. deliciosa</i>	Wood	2011	France	Rhône-Alpes	-	-	+	3	This study
CFBP 7907	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2011	France	Pays de la Loire	+	+	-	4	This study
CFBP 7908	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2011	France	Aquitaine	+	+	-	4	This study
CFBP 7909	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2012	France	Poitou-Charentes	+	+	-	4	This study
CFBP 7910	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2012	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study
CFBP 7950/	<i>A. chinensis</i>	Leaf	2010	New Zealand	Bay of Plenty	+	+	-	4	Butler et al. (2013), this study
ICMP 18806	<i>A. chinensis</i>	Leaf	2010	New Zealand	Bay of Plenty	+	+	-	4	Butler et al. (2013), this study
CFBP 7951/	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2010	New Zealand	Bay of Plenty	+	+	-	4	Butler et al. (2013), this study
ICMP 18807	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2010	New Zealand	Bay of Plenty	+	+	-	4	Butler et al. (2013), this study
CFBP 8025	<i>A. chinensis</i>	Leaf	2010	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study
CFBP 8026	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2010	France	Rhône-Alpes	-	-	+	3	This study
CFBP 8027	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2010	France	Rhône-Alpes	-	-	+	3	Vanneste et al. (2011)
CFBP 8028	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2010	France	Rhône-Alpes	-	-	+	3	This study
CFBP 8029	<i>A. chinensis</i>	Wood	2010	France	Aquitaine	-	-	+	3	Vanneste et al. (2011)
CFBP 8030	<i>A. chinensis</i>	Wood	2010	France	Aquitaine	-	-	+	3	Vanneste et al. (2011)
CFBP 8031	<i>A. deliciosa</i>	Wood	2011	France	Rhône-Alpes	-	-	+	3	This study
CFBP 8032	<i>A. chinensis</i>	Wood	2011	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study
CFBP 8033	<i>A. chinensis</i>	Wood	2011	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study
CFBP 8034	<i>A. deliciosa</i>	Wood	2011	France	Rhône-Alpes	-	-	+	3	This study
CFBP 8035	<i>A. deliciosa</i>	Wood	2011	France	Rhône-Alpes	-	-	+	3	This study
CFBP 8036	<i>A. deliciosa</i>	Wood	2011	France	Rhône-Alpes	-	-	+	3	This study
CFBP 8037	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2011	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study

(continued)

Table 1 (continued)

Strain name	Host	Sample	Year of isolation	Country of isolation	Region of isolation	Fluorescence on KB ^a	Aesculin ^b	avrD7 ^c	Biovar	Reference
CFBP 8038	<i>A. deliciaosa</i>	Leaf	2011	France	Poitou-Charentes	+	+	-	4	This study
CFBP 8039	<i>A. deliciaosa</i>	Leaf	2011	France	Aquitaine	+	+	-	4	This study
CFBP 8040	<i>A. deliciaosa</i>	Leaf	2011	France	Pays de la Loire	+	+	-	4	This study
CFBP 8041	<i>A. deliciaosa</i>	Leaf	2011	France	Pays de la Loire	+	+	-	4	This study
CFBP 8042	<i>A. deliciaosa</i>	Leaf	2011	France	Pays de la Loire	+	+	-	4	This study
CFBP 8043	<i>A. deliciaosa</i>	Leaf	2011	France	Pays de la Loire	+	+	-	4	This study
CFBP 8044/ICMP 19440	<i>A. chinensis</i>	Leaf	2011	Australia	Victoria	+	+	-	4	Chapman <i>et al.</i> (2012), this study
CFBP 8045/ICMP 19486	<i>A. chinensis</i>	Leaf	1990	Australia	Western Australia	+	+	-	4	Chapman <i>et al.</i> (2012), this study
CFBP 8046/ICMP 19441	<i>A. chinensis</i>	Leaf	2011	Australia	Victoria	+	+	-	4	Chapman <i>et al.</i> (2012), this study
CFBP 8047	<i>A. deliciaosa</i>	Leaf	2010	France	Rhône-Alpes	-	-	+	3	Vanneste <i>et al.</i> (2011)
CFBP 8048	<i>A. deliciaosa</i>	Leaf	2011	France	Pays de la Loire	+	+	-	4	This study
CFBP 8049	<i>A. deliciaosa</i>	Leaf	2011	France	Pays de la Loire	+	+	-	4	This study
CFBP 8050	<i>A. deliciaosa</i>	Leaf	2011	France	Pays de la Loire	+	+	-	4	This study
CFBP 8051	<i>A. deliciaosa</i>	Leaf	2011	France	Pays de la Loire	+	+	-	4	This study
CFBP 8052	<i>A. deliciaosa</i>	Leaf	2011	France	Midi-Pyrénées	-	-	+	3	This study
CFBP 8053	<i>A. chinensis</i>	Leaf	2011	France	Midi Pyrénées	-	-	+	3	This study
CFBP 8054	<i>A. deliciaosa</i>	Leaf	2011	France	Midi-Pyrénées	-	-	+	3	This study
CFBP 8055	<i>A. deliciaosa</i>	Leaf	2011	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study
CFBP 8056	<i>A. chinensis</i>	Wood	2012	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study
CFBP 8057	<i>A. deliciaosa</i>	Wood	2012	France	Rhône-Alpes	-	-	+	3	This study
CFBP 8058	<i>A. chinensis</i>	Wood	2012	France	Rhône-Alpes	-	-	+	3	This study
CFBP 8059	<i>A. deliciaosa</i>	Wood	2012	France	Rhône-Alpes	-	-	+	3	This study
CFBP 8060	<i>A. deliciaosa</i>	Wood	2012	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study
CFBP 8061	<i>A. deliciaosa</i>	Wood	2012	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study
CFBP 8062	<i>Actinidia</i> sp.	Leaf	2012	France	Rhône-Alpes	-	-	+	3	This study
CFBP 8063	<i>A. chinensis</i>	Wood	2012	France	Provence-Alpes-Côte d'Azur	-	-	+	3	This study
CFBP 8064	<i>A. deliciaosa</i>	Leaf	2012	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study
CFBP 8065	<i>A. chinensis</i>	Leaf	2012	France	Poitou-Charentes	-	-	+	3	This study
CFBP 8066	<i>A. deliciaosa</i>	Leaf	2012	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study
CFBP 8067	<i>A. deliciaosa</i>	Leaf	2012	France	Midi-Pyrénées	-	-	+	3	This study
CFBP 8085	<i>A. deliciaosa</i>	Leaf	2012	France	Pays de la Loire	+	+	-	4	This study
CFBP 8086	<i>A. deliciaosa</i>	Leaf	2012	France	Pays de la Loire	+	+	-	4	This study
CFBP 8087	<i>A. deliciaosa</i>	Wood	2013	France	Pays de la Loire	+	+	-	4	This study
CFBP 8088	<i>A. deliciaosa</i>	Wood	2013	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study
CFBP 8089	<i>A. deliciaosa</i>	Wood	2013	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study
CFBP 8090	<i>A. deliciaosa</i>	Wood	2013	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study
CFBP 8091	<i>A. deliciaosa</i>	Wood	2013	France	Midi-Pyrénées	-	-	+	3	This study

(continued)

Table 1 (continued)

Strain name	Host	Sample	Year of isolation	Country of isolation	Region of isolation	Fluorescence on KB ^a	Aesculin ^b	avrD1 ^c	Biovar	Reference
CFBP 8092	<i>A. deliciosa</i>	Wood	2013	France	Rhône-Alpes	-	-	+	3	This study
CFBP 8094	<i>A. deliciosa</i>	Wood	2013	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study
CFBP 8095	<i>A. deliciosa</i>	Wood	2013	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study
CFBP 8096	<i>A. deliciosa</i>	Wood	2013	France	Midi-Pyrénées	-	-	+	3	This study
CFBP 8097	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2013	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study
CFBP 8098	<i>A. chinensis</i>	Wood	2013	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study
CFBP 8099	<i>A. deliciosa</i>	Wood	2013	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study
CFBP 8100	<i>A. deliciosa</i>	Wood	2013	France	Midi-Pyrénées	-	-	+	3	This study
CFBP 8101	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2013	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study
CFBP 8102	<i>A. deliciosa</i>	Wood	2013	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study
CFBP 8103	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2013	France	Aquitaine	-	-	+	3	This study
CFBP 8104	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2013	France	Poitou-Charentes	+	+	-	4	This study
CFBP 8105	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2013	France	Pays de la Loire	+	+	-	4	This study
CFBP 8106	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2013	France	Pays de la Loire	+	+	-	4	This study
CFBP 8107	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2013	France	Aquitaine	+	+	-	4	This study
CFBP 8108	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2013	France	Poitou-Charentes	-	-	+	3	This study
CFBP 8109	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2013	France	Poitou-Charentes	-	-	+	3	This study
CFBP 8110	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2013	France	Poitou-Charentes	-	-	+	3	This study
CFBP 8160	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2013	France	Poitou-Charentes	+	+	-	4	This study
CFBP 8161	<i>A. deliciosa</i>	Leaf	2013	France	Centre	-	-	-	4	This study
ICMP 19071	<i>A. chinensis</i>	Leaf/wood	1997	Korea	Centre	-	-	+	2	Koh et al. (1994), Chapman et al. (2012)
NCPPB 3871	<i>A. deliciosa</i>	Leaf/wood	1992	Italy	Latina	-	-	+	1	Scortichini (1994), Ferrante & Scortichini (2010)

^aT₁ pathotype strain; CFBP: Collection Française de Bactéries associées aux Plantes; NCPPB: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria; ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants.

^a+, fluorescence; -, no fluorescence.

^b+, hydrolysis of aesculin; -, no hydrolysis of aesculin.

^c+, presence of *avrD1* gene; -, absence of *avrD1* gene.

^dVanneste et al. (2013).

Pathogenicity assays

A leaf inoculation assay and a stem inoculation assay were conducted. In both assays, 24-h-old bacterial colonies were resuspended in sterile water to a concentration of 10^9 CFU mL⁻¹. In addition to the two reference strains CFBP 7811 (biovar 3) and CFBP 7812 (biovar 4) isolated in New Zealand, two strains of Psa biovar 3 (CFBP 7906 and CFBP 7910) and three strains of Psa biovar 4 (CFBP 7908, CFBP 8039 and CFBP 8043) isolated in France were used. Distilled water was used as a negative control. Leaf inoculation was performed by spraying until run-off with a suspension of the test bacterial strain on the abaxial side of six unwounded leaves of two 3-month-old *in vitro* cultures of *A. deliciosa* 'Hayward'. The plants were incubated in a climatic room at 20°C with relative humidity ranging from 80 to 90% and a 12 h photoperiod. Symptoms were monitored daily.

Stem inoculation was performed by wounding the internode between the two youngest fully developed leaves of six 3-month-old seedlings of *A. deliciosa* 'Hayward' and *A. chinensis* 'Hort16A' with a wooden toothpick previously dipped in the bacterial suspension. The symptoms were scored on a scale of 0 to 3: 0 corresponding to no symptoms, 1 to water soaking and necrosis around the wound site, 2 to necrosis along the inoculation point and 3 to stem collapse. The scores were averaged for each strain × cultivar combination to calculate a disease index (DI). Data were analysed with the nonparametric Kruskal–Wallis test (significance level of 5%) followed by the Steel–Dwass–Critchlow–Fligner multiple comparison test using XLSTAT 2011 software.

For the two inoculation methods, Koch's postulates were verified by characterizing the bacteria reisolated from the symptoms.

Housekeeping gene amplifications and sequencing

Four genes, *gapA*, *gltA* (also known as *cts*), *gyrB* and *rpoD*, which code for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, citrate synthase, DNA gyrase B and sigma factor 70, respectively, were amplified using primers designed by Sarkar & Guttman (2004) and Hwang *et al.* (2005). In addition, a set of primers was designed using PRIMER3 (Rozen & Skaletsky, 2000) to amplify *gapA* from *P. viridiflava* CFBP 2107 (Table S2). PCRs were carried out in a final volume of 20 µL containing 1 U of Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 1× buffer, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0.2 µM of each primer and 1 µL of boiled extract. Reactions were performed on a Veriti 96-well thermal cycler (Applied Biosystems) using a thermal cycling programme of 3 min at 95°C, followed by 35 cycles of 45 s at 95°C, 45 s at T_m (Table S2) and 1 min at 72°C, and finished with 72°C for 5 min. The purity and yield of each amplicon were verified by loading 8 µL of the reaction product onto 1.5% agarose gel in 1 × TBE buffer. The two strands of the PCR products were sequenced by the Genoscreen Company (Lille, France).

The partial sequences of the four housekeeping genes of the strains of Psa isolated in France were deposited on GenBank under the accession numbers KF937399 to KF937786.

MLSA and clonal genealogy

Sequence and phylogenetic analyses were performed using GENEIOUS v. 4.8.5 (Biomatters) and BIOEDIT programs (Hall, 1999). The sequences were concatenated according to the alphabetic order of the gene. The concatenated data set was 3159 bp long

(*gapA* from bp 1 to 675, *gltA* from 676 to 1671, *gyrB* from 1672 to 2346, *rpoD* from 2347 to 3159).

A neighbour joining (NJ) tree was built with MEGA v. 5.1 using the Jukes–Cantor distance methods with the DNA sequences for the four housekeeping genes of Psa strains, six isolated in France, one in Japan, two in Italy, three in New Zealand and one in Australia (Table 1) and 10 type or pathotype strains of *Pseudomonas* representative of the genomospecies (G) defined by Gardan *et al.* (1999) (*P. syringae* pv. *syringae* CFBP 4702 for G1, *P. syringae* pv. *phaseolicola* CFBP 1390 for G2, *P. syringae* pv. *morsprunorum* CFBP 2351 and *P. syringae* pv. *tomato* CFBP 2212 for G3, *P. syringae* pv. *coronofasciens* CFBP 2216 for G4, *P. viridiflava* CFBP 2107 for G6, *P. syringae* pv. *tagetis* CFBP 1694 for G7, *P. syringae* pv. *theae* CFBP 2353 and *P. avellanae* CFBP 4060 for G8 and *P. cannabina* pv. *cannabina* CFBP 2341 for G9). The strain of *P. fluorescens* CFBP 2102 was used to root the tree.

Maximum likelihood (ML) trees were constructed with the sequence of each gene and with the concatenated sequences for Psa strains. The strain of *P. syringae* pv. *tomato* CFBP 2212 was used to root the trees. The model of evolution was determined using MODELTEST v. 3.7 with PAUP. The model scores were evaluated with the hierarchical likelihood ratio (hLRT) and the standard Akaike information criterion (AIC). Phylogenetic trees and bootstrap values were obtained for each gene and the concatenated data by the PHYML (Guindon *et al.*, 2010) method using TOPALi v. 2.5 (Milne *et al.*, 2009; available at <http://www.topali.org/>). Bootstrap analyses were done with 1000 replicates for NJ and ML analyses. The trees were visualized in MEGA v. 5.1. The phylogenetic congruence between the ML trees of each locus and the concatenated sequences was tested using the Shimodaira–Hasegawa test (Shimodaira & Hasegawa, 1999) implemented in the DNAML program from PHYLIP (Felsenstein, 2005).

In order to estimate the clonal genealogy of the four biovars of Psa, CLONALFRAME software (Didelot & Falush, 2007) was used. CLONALFRAME uses a coalescent-based Bayesian method to infer strain relationships. Three independent runs were performed on housekeeping gene sequences used for the MLSA. The parameter space was explored using a Markov chain Monte Carlo (MCMC) simulation of 1 000 000 iterations, out of which 500 000 were considered as burn-in. The interval genealogy sampling was set at 100, which ensured good independence between successive sampling.

Molecular data analysis

Rates of amino acid replacement over synonymous mutation K_a/K_s ratio were estimated using the Nei and Gojobori method (Nei & Gojobori, 1986) implemented in MEGA v. 5.1 (Tamura *et al.*, 2011). Estimations of recombination events were performed using a method based on seven different nonparametric detection algorithms implemented in RDP v. 3.38 (Martin *et al.*, 2005). Recombinant events were accepted when detected with at least three out of seven detection methods implemented in this software (Mhedbi-Hajri *et al.*, 2013).

Results

Isolation and characterization of strains of Psa isolated in France

From the 989 samples with symptoms received between 2010 and 2013, 280 strains with morphology similar to

that of Psa were isolated. They did not display cytochrome c oxidase or arginine dihydrolase activity. They produced levan, induced an HR on tobacco leaves but did not rot potato tissues. PCR performed with the primers developed by Rees-George *et al.* (2010) and by Koh & Nou (2002) generated amplicons of the expected size for Psa. None of the 280 strains produced a DNA fragment of the expected size using the primers designed to amplify the genes *cfl* and *argK*, nor did they produce syringomycin. Among the 280 strains, 248 did not hydrolyse aesculin and no fluorescent pigment was observed under UV light on King's B medium. Thus, these 248 strains had all the characteristics of strains of Psa biovar 3. The remaining 32 strains hydrolysed aesculin, were fluorescent on King's B medium with the exception of CFBP 8161, and did not produce a 226 bp DNA fragment with the primers designed to amplify *avrD1* (Gallelli *et al.*, 2011). These 32 strains, therefore, had all the characteristics of strains of Psa biovar 4. The origin of the strains is presented in Table S1.

The six strains of Psa biovar 3 and biovar 4 that were tested were motile and INA negative. The results of the two repetitions per strain of the Biolog plates were combined. Six carbon sources (Tween 40, Tween 80, *i*-erythritol, β -hydroxybutyric acid, α -ketobutyric acid, α -ketoglutaric acid, L-histidine and L-leucine) were catabolized by strains of biovar 4 and not those of biovar 3. In contrast, uridine was weakly used by strains of Psa biovar 3 but not by those of biovar 4 (Table S3).

The four biovars of Psa displayed different patterns when analysed by BOX PCR (Fig. 1). Strains of Psa bi-

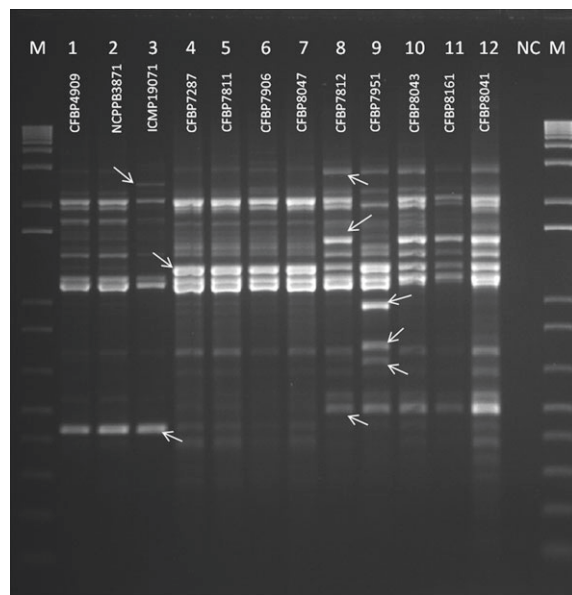


Figure 1 Agarose gel electrophoresis of DNA samples after BOX PCR. M, 1 kb Plus DNA ladder; lanes 1 and 2 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) strains biovar 1; lane 3 Psa strain biovar 2; lanes 4, 5, 6 and 7 Psa strains biovar 3; lanes 8, 9, 10, 11 and 12 Psa strains biovar 4; NC, negative control (water). Arrows indicate bands that are differentially represented between the different biovars.

ovar 1 and 2 displayed almost identical patterns with the presence of a band at 430 bp and the absence of a band of approximately 1300 bp. The strains of Psa biovar 2 presented an extra band of about 2500 bp. All 248 French strains identified as strains of biovar 3, presented a BOX PCR pattern similar to that of strains of Psa biovar 3 isolated from Italy (CFBP 7287) and New Zealand (CFBP 7811). All Psa biovar 4 strains presented extra bands of 500, 1500 and 2900 bp. The pattern of the 32 French strains identified as strains of biovar 4 was similar to the pattern of the CFBP 7812 strain of Psa biovar 4 isolated in New Zealand. However, one strain isolated in New Zealand (CFBP 7951) displayed a different pattern with three additional bands of 680, 780 and 950 bp.

Strains of Psa biovar 3 were isolated from leaves, wood, flower buds and roots of *A. deliciosa*, *A. chinensis* and *A. arguta*, mostly from orchards located in the main kiwifruit production areas in the southwest and southeast of France, which were planted in the last 10 to 20 years. In contrast, strains of Psa biovar 4 were isolated only from leaves of *A. deliciosa* mostly in older orchards from the northwest of France. These older orchards were planted in the 1970s and 1980s with plants mainly imported from New Zealand or with plants that were obtained from those vines (Table S1; Fig. 2).

Symptoms caused by the two biovars

When bacterial suspensions of strains of Psa biovar 3 and Psa biovar 4 were sprayed on to leaves of *A. delici-*

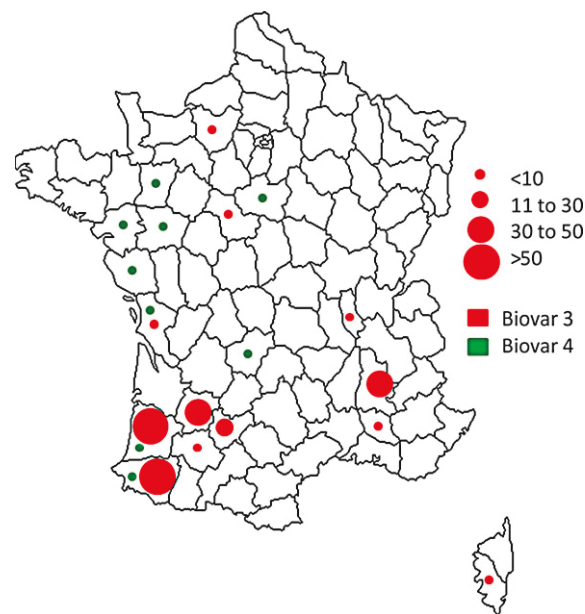


Figure 2 Distribution of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) biovars 3 and 4 in the different departments of France from 2010 to June 2013. The circles indicate the number of orchards contaminated by Psa biovar 3 (in red) or biovar 4 (in green).

osa ‘Hayward’, similar symptoms developed of angular, dark brown spots, sometimes surrounded by a chlorotic halo and located between the veins (Fig. S1).

When stem-inoculated, the three *Psa* biovar 3 strains caused necrosis and collapse of the inoculated stems on *A. deliciosa* ‘Hayward’ and *A. chinensis* ‘Hort16A’ giving an average disease index (DI) of 2.5 to 3 (Fig. 3). In contrast, the DI of plants inoculated with the four strains of *Psa* biovar 4 was below 0.5, corresponding to no reaction or local water soaking at the inoculation point. DI differences between the two biovars were statistically significant ($P < 0.05$). There were no significant differences among strains of the same biovar ($P > 0.05$).

Haplotypic diversity measured by MLSA

Of the 280 strains isolated, 72 strains (50 of biovar 3 and 22 of biovar 4) representative of the different regions, hosts and years of isolation were selected for genetic analysis (Table 1).

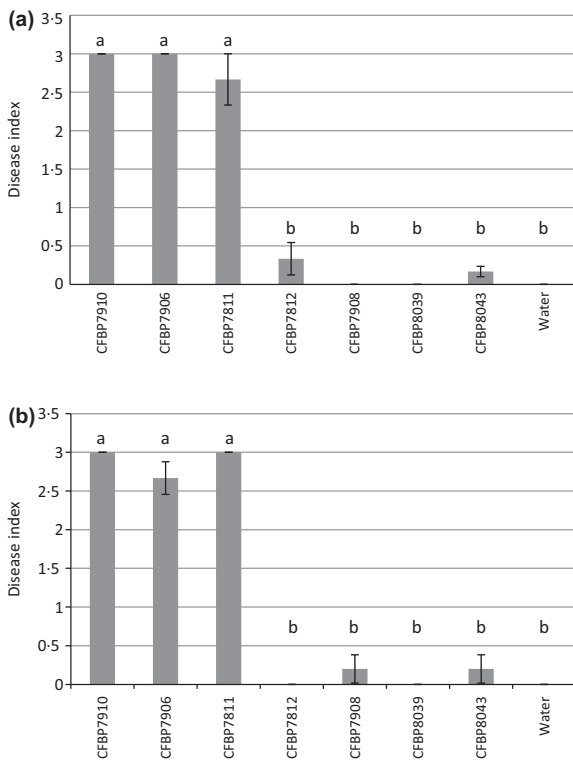


Figure 3 Pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3 (CFBP 7906, CFBP 7910, CFBP 7811) and biovar 4 (CFBP 7812, CFBP 7908, CFBP 8039, CFBP 8043) on seedlings of *Actinidia deliciosa* ‘Hayward’ 9 days after inoculation (a) and *A. chinensis* ‘Hort16A’ 8 days after inoculation (b). The disease index is proportional to the length of necrosis on the stem. Vertical bars represent standard errors of the means. Columns with the same letter are not significantly different ($P > 0.05$) according to Kruskal–Wallis test.

All *Psa* strains, including those isolated from France, clustered within the phylogroup that groups genomospecies 8 and 3 (Fig. 4). Strains of *Psa* biovar 3 isolated from France clustered with *Psa* biovar 3 strains isolated from New Zealand (CFBP 7811) and from Italy during the latest outbreak (CFBP 7287) (Figs 4 & 5). Strains of *Psa* biovar 4 isolated from France clustered with *Psa* biovar 4 strains isolated from New Zealand and Australia (Figs 4 & 5). *Pseudomonas syringae* pv. *theae* grouped with *Psa* biovars 1, 2 and 3 and not with *Psa* biovar 4.

All the strains of *Psa* examined by MLSA clustered in two groups, one corresponding to biovars 1, 2 and 3, and the other to biovar 4. This clustering is supported by medium to strong bootstrap values (>77%; Fig. 5). The phylogenetic trees built with the ML algorithm for each housekeeping gene (data not shown) were significantly congruent with that built using concatenated sequences (Fig. 5) as indicated by the Shimodaira–Hasegawa test ($P > 0.05$; Table 2). The 72 strains isolated from France fitted into the clusters corresponding to either biovar 3 or biovar 4. The diversity within *Psa* biovar 4 strains was larger than that among the three other biovars, as revealed by the longer length of the internal branches. The cluster of *Psa* strains biovar 4 could be divided in four lineages (L): L1 consisted of strains isolated from New Zealand and Australia and one strain isolated from France (CFBP 8161); L2 contained only one strain (CFBP 8043) isolated from France; L3 contained only one strain (CFBP 7951) isolated from New Zealand; and L4 is made up of strains isolated only from France. No correlation was found between the geographical origin or the plant host and the lineages of strains of *Psa* biovar 4, but the majority of strains isolated from France were included in the L4 lineage.

Clonal genealogy of Psa strains

The three coalescent trees obtained by CLONALFRAME were identical to each other and one of them is presented in Figure 6. The coalescent tree of the *Psa* strains revealed the same groups as that obtained with the phylogeny approach using the ML analysis (Fig. 6). The *Psa* strains were grouped in three clonal complexes: the first complex contains strains of *Psa* biovar 1, 2 and 3; the second contains strains of *Psa* biovar 4 L1 and L2; and the third contains strains of *Psa* biovar 4 L3 and L4.

According to CLONALFRAME analysis, the common ancestor of the *Psa* biovar 1, 2 and 3 is as recent (coalescent unit of 0.45) as that of the *Psa* biovar 4 L1 and L2 (coalescent unit of 0.45), but more recent than that of the *Psa* biovar 4 L3 and L4 (coalescent unit of 0.71). The four lineages of *Psa* biovar 4 coalesced at the same time (coalescent unit of 1.30) as the common ancestor of the biovars 1, 2, 3 and 4 (coalescent unit of 1.30). No recent common ancestor was found for the four biovars.

Molecular diversity within and between biovars

The K_a/K_s ratio estimated for each gene of the four biovars is null for *gapA*, *gltA* and *gyrB* genes and equal to

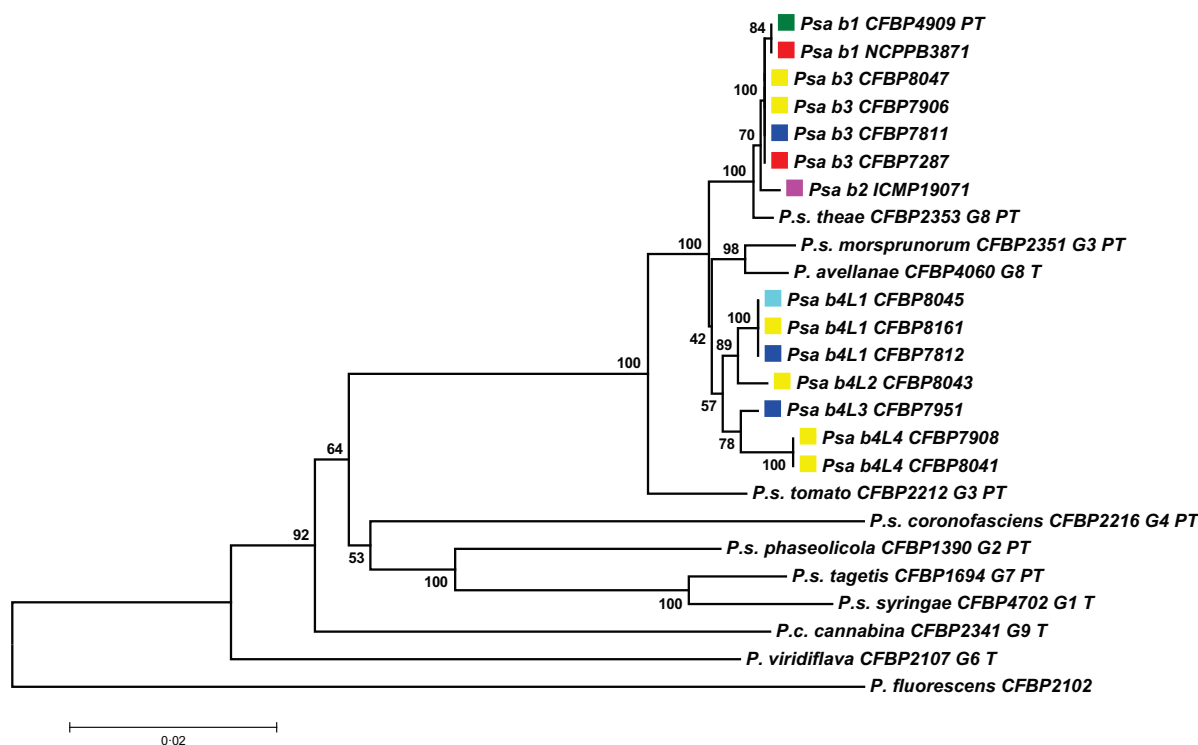


Figure 4 Neighbour joining tree constructed with the concatenated partial sequences of four housekeeping genes (*gapA*, *gltA*, *gyrB* and *rpoD*). Percentage of bootstrap scores obtained for 1000 replicates are indicated at each node. The labels G1 to G8 mentioned after the name of *Pseudomonas syringae* (Ps) pathovars indicate the genomospecies as defined by Gardan *et al.* (1999). T, type strain; PT, pathotype strain; b, biovar; L, lineage. The colours represent the geographical origin of the strains: dark blue, New Zealand; light blue, Australia; yellow, France; pink, Korea; red, Italy; and green, Japan. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site.

0.123 for the *rpoD* gene, suggesting strong to moderate purifying selection for these genes. Combinations of primers designed by Sarkar & Guttman (2004) and by Hwang *et al.* (2005) were used in order to obtain longer partial DNA sequences of the housekeeping genes, expecting to increase the number of polymorphic sites. However, the value of the K_a/K_s ratio found for the housekeeping gene *rpoD* in this study was the same as that described by Chapman *et al.* (2012) who used shorter DNA sequences. No additional polymorphic sites were observed with the analysis of longer sequences for these four housekeeping genes.

The RDP program was used to detect possible recombination events. Only one out of the seven detection methods detected a possible recombinant event for the gene *gyrB*, so no significant recombination event was detected in the data set.

Discussion

A total of 280 strains isolated from *A. deliciosa* or *A. chinensis* from different regions of France between 2010 and June 2013 were identified as Psa biovar 3 or biovar 4. When the outbreak of bacterial canker of kiwifruit was reported in France, only one haplotype of Psa was detected in French orchards (Vanneste *et al.*, 2011), Psa biovar 3. In this study it is shown that strains of Psa

biovar 3 and 4 have been present in France since at least 2010. This was confirmed by different methods including BOX PCR, which can be used to distinguish strains of biovar 3 from those of biovar 4 (Vanneste *et al.*, 2013). The BOX PCR pattern of the 32 strains of biovar 4 isolated in France was similar to that of the Psa biovar 4 strain CFBP 7812 isolated in New Zealand. However, a few differences were found compared with the Psa biovar 4 strain CFBP 7951 also isolated in New Zealand. Geographical populations could not be delineated by the BOX PCR study. The differences observed by Mazzaglia *et al.* (2011) using BOX PCR between strains of different geographic origin reflect that in that study each geographic location was represented by strains of only one biovar. Thus, the differences were due to the strains belonging to different biovars and not to their geographic origin.

MLSA, based on housekeeping genes, is a powerful tool to study phylogenetic relationships and species delineation of bacterial strains. The four housekeeping genes (*gapA*, *gltA*, *gyrB* and *rpoD*) selected by Hwang *et al.* (2005) have already been used to explore the diversity of *P. syringae* (Hwang *et al.*, 2005) and Psa (Ferrante & Scortichini, 2010; Chapman *et al.*, 2012). In this study this set of genes was used to perform MLSA on Psa strains and some type and pathotype strains representing the *P. syringae* genomospecies as defined by Gardan

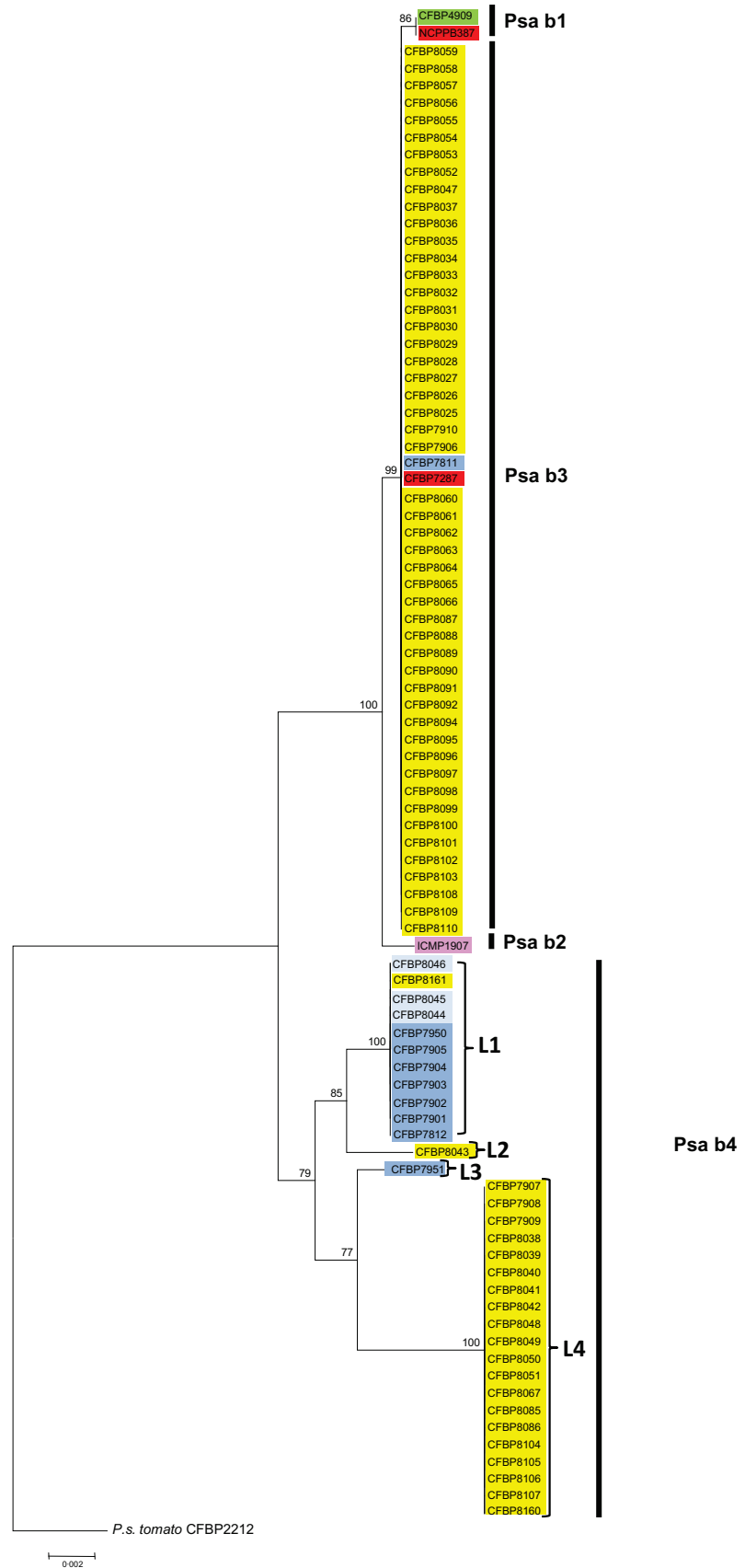


Figure 5 Maximum likelihood tree constructed with the concatenated partial sequences of four housekeeping genes (*gapA*, *gltA*, *gyrB* and *rpoD*) of 88 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains. Percentages of bootstrap scores obtained for 1000 replicates are indicated at each node. b, biovar; L, lineage. The colours represent the geographical origins of the strain: dark blue, New Zealand; light blue, Australia; yellow, France; pink, Korea; red, Italy; and green, Japan. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site.

Table 2 Results of the Shimodaira–Hasegawa test for congruence of tree topologies run on each of the maximum likelihood trees based on four housekeeping genes, individually and as concatenated (conc) sequences, of 88 strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

Locus	P-value				conc
	<i>gapA</i>	<i>gltA</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>	
<i>gapA</i>		0.001	0.000	0.100	0.000
<i>gltA</i>	0.027		0.000	0.276	0.026
<i>gyrB</i>	0.011	0.000		0.284	0.015
<i>rpoD</i>	0.058	0.001	0.518		0.162
conc	0.494	0.528	0.598	0.890	

et al. (1999). The architecture of the NJ tree obtained (Fig. 4) was similar to the one described by Bull *et al.* (2011). Strains of Psa isolated in France clustered with strains belonging to genomospecies 8 and genomospecies 3 (G8 and G3) *sensu stricto* Gardan *et al.* (1999) and were closely related to other Psa strains of biovar 3 and 4. The structure of the tree and the localization of Psa strains within the tree were similar to results obtained by Chapman *et al.* (2012) with seven housekeeping genes. The strain of *P. syringae* pv. *theae* was more closely linked to Psa biovars 1, 2 and 3 strains than to the group of Psa biovar 4 strains. The strains of Psa biovar 4 were spread into groups different from those of strains of *P. syringae* pv. *morsprunorum*, *P. syringae* pv. *avellanae*, *P. syringae* pv. *tomato* and Psa biovar 1, 2 and 3, but were included in the G3 + G8 complex described by Bull *et al.* (2011).

In this study MLSA allowed classification of Psa strains of biovar 4 isolated in France, New Zealand and Australia into four lineages. The diversity found within biovar 4 is greater than that described earlier (Butler *et al.*, 2013; McCann *et al.*, 2013). These authors showed that one strain isolated in New Zealand, CFBP 7951, did not cluster with the other New Zealand or Australian isolates. CFBP 7951 is the only strain in L3; it was called Psa NZ LV14 by McCann *et al.* (2013) and strains with DNA sequences for the four housekeeping genes (*gapA*, *gltA*, *gyrB* and *rpoD*) identical to that of CFBP 7951 were labelled PsHa by Butler *et al.* (2013). The phylogenetic relationships observed in this study did not show a correlation between the lineages of Psa biovar 4 and the geographical origin or the plant host. The fact that only strains isolated from France are found in L4 could simply be due to the limited number of strains isolated from New Zealand and Australia that were examined in this study.

This is the first account of Psa biovar 4 isolation in France and in Europe, and provides evidence that strains of Psa biovar 4 have been present in France since the beginning of the outbreak caused by strains of Psa biovar 3 in 2010. Leaf symptoms caused by strains of biovar 4 are identical to those caused by strains of biovar 3. Psa biovar 4 might have been present long before Psa biovar 3 was detected; however, any presence of biovar 4 in the old *A. deliciosa* orchards did not have an economic impact on kiwifruit production. Thus biovar 4 has not

been detected until sampling for Psa detection was systematically conducted in the recent outbreak caused by strains of biovar 3 in 2010. In France, Psa biovar 4 was isolated only from leaves in old *A. deliciosa* orchards planted at the end of the 1970s with kiwifruit vines that originated from New Zealand. Strains of Psa biovar 4 could have been brought from New Zealand with these plants. Other kiwifruit vines from New Zealand were imported into Europe and the movement of plants between France and other European countries may have also helped to spread Psa biovar 4 within Europe; if this is the case, then the diversity within biovar 4 might even be larger than that described in this study. Alternatively, Psa biovar 4 might have host(s) other than kiwifruit, in which case it is possible that Psa biovar 4 originated in Europe or that it was introduced a long time ago or from a country other than New Zealand. Interestingly, Ferrante & Scortichini (2014) recently showed that, in contrast to strains of Psa biovars 1, 2 and 3, Psa strains of biovar 4 isolated in New Zealand (ICMP 18802, ICMP 18882, ICMP 18883) induce extensive symptoms on sour cherry (*Prunus cerasus*). That Psa biovar 4 might have been present in France and possibly Europe for a relatively long period of time is supported by the molecular diversity of strains of biovar 4 isolated in France. This work demonstrates that the biovar 4 Psa strains collected mainly in France, New Zealand and Australia structure into two clusters and four lineages as revealed by the NJ and ML trees (Figs 4 & 5).

Different studies conducted on a limited number of strains indicated that strains of Psa biovar 3 isolated from different parts of the world showed some differences in genes potentially related to pathogenicity; all strains isolated from Europe were similar (Mazzaglia *et al.*, 2012; Butler *et al.*, 2013; McCann *et al.*, 2013). The introduction of Psa biovar 3 into Europe has been a recent event and it is possible that a single strain was introduced and then spread throughout Europe. Based on genome sequence analyses, Mazzaglia *et al.* (2012), Butler *et al.* (2013) and McCann *et al.* (2013) concluded that strains of Psa biovar 3 had a Chinese common ancestor. In this study the clonal genealogy of strains of Psa has been estimated with CLONALFRAME which has already been used for coalescent analysis of plant pathogenic bacteria (Mhedbi-Hajri *et al.*, 2013). The coalescent tree indicated that Psa biovars 1, 2 and 3 had a more recent common ancestor than they had with biovar 4. This study cannot reveal a common ancestor to the four biovars and suggests that other strains, not yet isolated, are involved in the evolution of *P. syringae* strains associated with kiwifruit.

All these results show important similarities and differences between Psa biovars 1, 2 and 3 and biovar 4: they infect the same host and cause similar symptoms on leaves. However, in contrast to strains of the other biovars, strains of biovar 4 do not induce shoot die-back or canker formation; they also have different biochemical properties. In Australia, strains of Psa biovar 4 were isolated 20 years ago and did not result in any noticeable

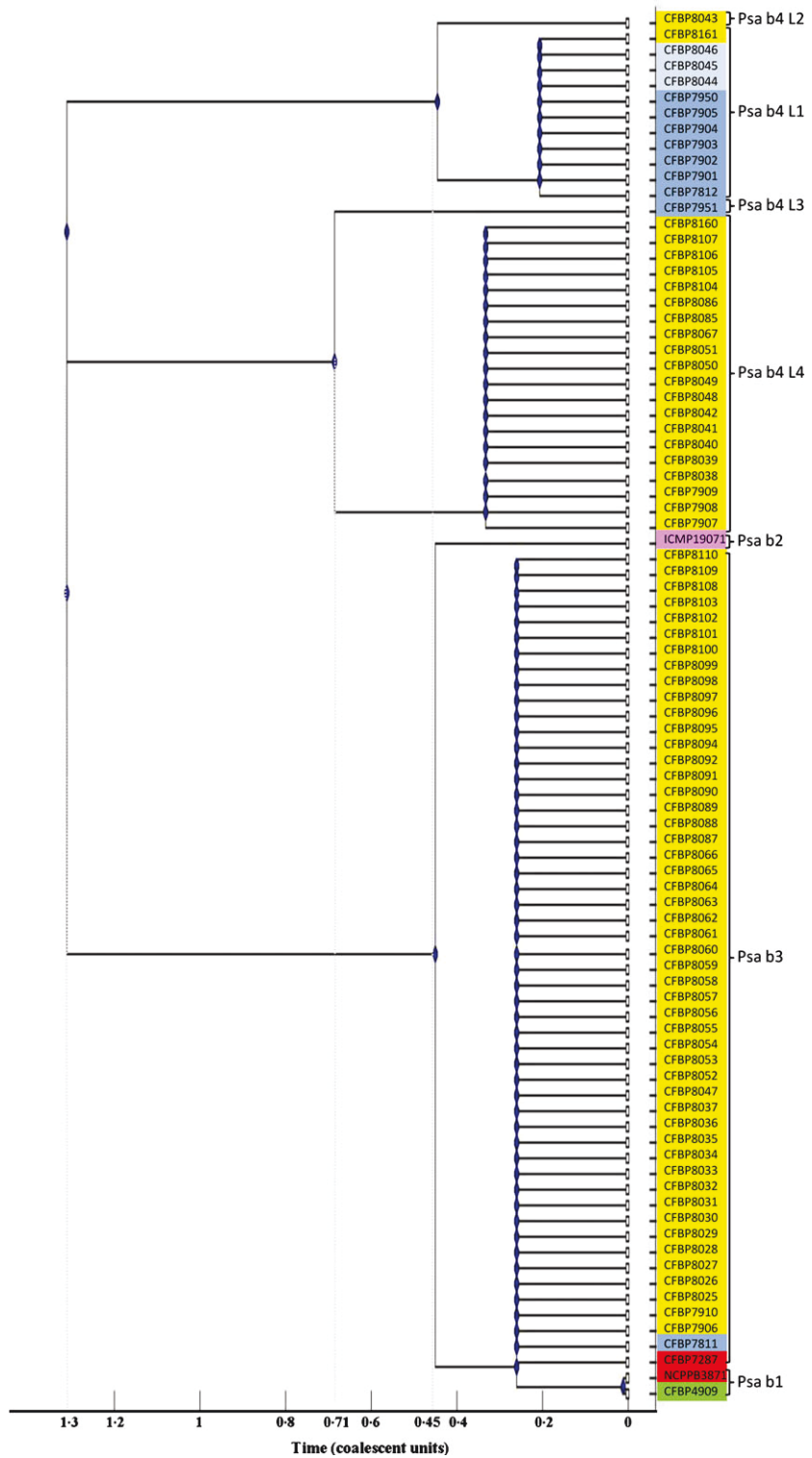


Figure 6 Coalescent tree showing the clonal genealogy of strains of the four biovars of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) based on partial sequences of four housekeeping genes (*gapA*, *gltA*, *rpoD* and *gyrB*). b, biovar; L, lineage. The colours represent the geographical origins of the strain: dark blue, New Zealand; light blue, Australia; yellow, France; pink, Korea; red, Italy; and green, Japan.

loss of productivity (EPP0, 2011). Strains of Psa biovar 4 isolated in New Zealand were most probably present long before strains of Psa biovar 3 were detected (Vanneste *et al.*, 2013). No loss of productivity has been reported in New Zealand due to the presence of Psa biovar 4 (Vanneste *et al.*, 2013). It is crucial to

distinguish strains of Psa biovar 4 from Psa biovar 1, 2 and 3 as these two groups of strains cause two distinct diseases on the same host plant and the management of the two diseases requires different control measures. The legislation written to protect kiwifruit orchards from the devastating disease caused by Psa biovars 1, 2 or 3 can

force kiwifruit producers to take drastic measures, such as the removal of the orchard. Such measures are disproportionate to the economic consequences induced by strains of *Psa* biovar 4.

In other pathosystems there are examples of closely related pathogenic bacteria that cause different symptoms on the same host range; they are distinguished by a different pathovar name in agreement with the official definition of a pathovar: 'The term *pathovar* is used to refer to a strain or set of strains with the same or similar characteristics, differentiated at infrasubspecific level from other strains of the same species or subspecies on the basis of distinctive pathogenicity to one or more plant hosts' (http://www.isppweb.org/about_tppb_naming.asp). On rice, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), the causal agent of bacterial blight is vascular, while *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc), the causal agent of bacterial leaf streak is not (Niño-Liu *et al.*, 2006). On Brassicaceae, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the causal agent of black rot, is vascular but *X. campestris* pv. *raphani* causes only bacterial leaf spot (Fargier & Manceau, 2007). In the case of *P. syringae* pathogenic to kiwifruit, two groups, genetically distinct with only one able to cause systemic infection, are called *P. syringae* pv. *actinidiae*. Ferrante & Scortichini (2014) proposed to remove *Psa* biovar 4 from the pathovar *actinidiae*, which would still contain strains of *Psa* biovars 1, 2 and 3. Moreover, the phylogenetic study of strains of *Psa* revealed that *Psa* biovars 1, 2 and 3 strains are genetically related to each other and close to *P. syringae* pv. *theae*, whereas *Psa* biovar 4 strains grouped separately. That these two different pathogens share the same name is confusing. Therefore, the authors propose to keep the name *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* for the strains that cause leaf spot and vascular infection, these being the strains of *Psa* biovars 1, 2 and 3, in accordance with the description provided by Takikawa *et al.* (1989); and it is proposed to allocate the biovar 4 strains, which cause only leaf spot, to a new pathovar: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov.

Description of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov

Pseudomonas syringae pv. *actinidifoliorum* (ac.ti.ni.di.fo.li.o') rum. N. L. fem. n. Actinidia, systematic name of the kiwifruit plant, L. neut. plur. gen. foliorum of the leaves, N. L. neut. plur. gen. n. *actinidifoliorum* referring to the isolation of strains of the kiwifruit leaves).

Colonies of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* cultivated on nutrient agar plates are round, convex, glistening, viscous, translucent and white. The bacteria are Gram-negative rods, aerobic, motile, can produce fluorescent pigment on King's B medium and do not have the genes coding coronatine (*cfl*) and phaseolotoxin (*argK*). Positive reactions are: levan production, tobacco hypersensitive reaction and hydrolysis of aesculine. Negative reactions are: cytochrome oxidase, arginine hydrolase, potato rot test, ice nucleation activity.

Pseudomonas syringae pv. *actinidifoliorum* uses: Tween 40, Tween 80, L-arabinose, D-arabitol, *i*-erythritol, D-fructose, D-galactose, α -D-glucose, *m*-inositol, D-mannitol, D-mannose, D-sorbitol, sucrose, pyruvic acid methyl ester, succinic acid mono-methyl ester, acetic acid, *cis*-aconitic acid, citric acid, D-galactonic acid lactone, D-galacturonic acid, D-gluconic acid, D-glucosaminic acid, D-glucuronic acid, β -hydroxybutyric acid, β -hydroxybutyric acid, α -ketobutyric acid, α -ketoglutaric acid, propionic acid, quinic acid, D-saccharic acid, succinic acid, bromosuccinic acid, succinamic acid, L-alaninamide, D-alanine, L-alanine, L-alanyl-glycine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, glycyl-L-glutamic acid, L-histidine, L-leucine, L-proline, L-pyroglutamic acid, L-serine, L-threonine, γ -aminobutyric acid, inosine and glycerol as a carbon source. Formic acid, malonic acid, L-ornithine and uridine are only used weakly as a carbon source. The following carbon sources are not used by *P. syringae* pv. *actinidifoliorum*: α -cyclodextrin, dextrin, glycogen, N-acetyl-D-galactosamine, N-acetyl-D-glucosamine, adonitol, D-cellobiose, L-fucose, gentiobiose, α -D-lactose, lactulose, maltose, D-melibiose, β -methyl-D-glucoside, D-psicose, D-raffinose, L-rhamnose, D-trehalose, turanose, xylitol, α -hydroxybutyric acid, γ -hydroxybutyric acid, *p*-hydroxyphenylacetic acid, *p*-hydroxyphenylacetic acid, itaconic acid, α -ketovaleric acid, D,L-lactic acid, sebacinic acid, glucuronamide, glycyl-L-aspartic acid, hydroxy-L-proline, L-phenylalanine, D-serine, D,L-camitine, urocanic acid, thymidine, phenylethylamine, putrescine, 2-aminoethanol, 2,3-butanediol, D,L, α -glycerol phosphate, α -D-glucose-1-phosphate and D-glucose-6-phosphate.

Pseudomonas syringae pv. *actinidifoliorum* is a plant pathogen that cause leaf spots on *A. chinensis* and *A. deliciosa*. The pathotype strain is CFBP 8039.

Acknowledgements

The authors wish to thank the French International Office of the Kiwi (BIK), SCAAP kiwifruits de France, Anses, France and The New Zealand Institute for Plant & Food Research Limited, Ruakura Research Centre, New Zealand, for financial support. The authors also thank Janet Yu and Deirdre Cornish for their help during pathogen test interpretation, Corinne Audusseau and Sandrine Pailard for the isolation of the French strains, Sophie Bonneau and Karine Durand for their help during the MLSA, and Perrine Portier, Martial Briand and Géraldine Taghouti at the French Collection of Plant-associated Bacteria (CIRM-CFBP) for providing and maintaining bacterial strains. A. C. is supported by a fellowship provided by Anses and Région Pays de la Loire, France.

References

- Balestra GM, Mazzaglia A, Quattrucci A, Renzi M, Rossetti A, 2009. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Jin Tao kiwi plants in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 299–301.
- Bereswill S, Bugert P, Völksch B, Ullrich M, Bender CL, Geider K, 1994. Identification and relatedness of coronatine-producing *Pseudomonas*

- syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2924–30.
- Bourgouin B, Fritsch J, 2013. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) sur kiwi, l'évolution depuis 2010. *Phytoma-La Défense des Végétaux* 668, 26–9.
- Bull CT, Clarke CR, Cai R, Vinatzer BA, Jardini TM, Koike ST, 2011. Multilocus sequence typing of *Pseudomonas syringae sensu lato* confirms previously described genomospecies and permits rapid identification of *P. syringae* pv. *coriandricola* and *P. syringae* pv. *apii* causing bacterial leaf spot on parsley. *Phytopathology* 101, 847–58.
- Butler MI, Stockwell PA, Black MA, Day RC, Lamont IL, Poulter RTM, 2013. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* from recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker belong to different clones that originated in China. *PLoS ONE* 8, e57464.
- Chapman JR, Taylor RK, Weir BS *et al.*, 2012. Phylogenetic relationships among global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Phytopathology* 102, 1034–44.
- Didelot X, Falush D, 2007. Inference of bacterial microevolution using multilocus sequence data. *Genetics* 175, 1251–66.
- EPPO, 2011. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Australia. EPPO Reporting Service no. 6, 2011/130.
- Fargier E, Manceau C, 2007. Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology* 56, 805–18.
- Felsenstein J, 2005. *PHYLIP Phylogeny Inference Package. Version 3.63*. Seattle, WA, USA: Department of Genetics, University of Washington.
- Ferrante P, Scortichini M, 2010. Molecular and phenotypic features of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated during recent epidemics of bacterial canker on yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in central Italy. *Plant Pathology* 59, 954–62.
- Ferrante P, Scortichini M, 2014. Redefining the global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* based on pathogenic, molecular and phenotypic characteristics. *Plant Pathology*. doi:10.1111/ppa.12236.
- Gallelli A, L'Aurora A, Loreti S, 2011. Gene sequence analysis for the molecular detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: developing diagnostic protocols. *Journal of Plant Pathology* 93, 425–35.
- Gardan L, Shafik H, Belouin S, Broch R, Grimont F, Grimont P, 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 469–78.
- Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O, 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PHYLIP 3.0. *Systematic Biology* 59, 307–21.
- Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95–8.
- Hwang MS, Morgan RL, Sarkar SF, Wang PW, Guttman DS, 2005. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 5182–91.
- Koh YJ, Nou IS, 2002. DNA markers for identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Molecules and Cells* 13, 309–14.
- Koh Y, Cha BJ, Chung HJ, Lee DH, 1994. Outbreak and spread of bacterial canker of kiwifruit. *Korean Journal of Plant Pathology* 10, 68–72.
- Lelliott R, Billing E, Hayward A, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Microbiology* 29, 470–89.
- Lindow S, Arny D, Upper C, 1978. *Erwinia herbicola*: a bacterial ice nucleus active in increasing frost injury to corn. *Phytopathology* 68, 523–7.
- Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, De Bruijn F, 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2286–95.
- Martin DP, Williamson C, Posada D, 2005. RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* 21, 260–2.
- Mazzaglia A, Renzi M, Balestra GM, 2011. Comparison and utilization of different PCR-based approaches for molecular typing of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains from Italy. *Canadian Journal of Plant Pathology* 33, 8–18.
- Mazzaglia A, Studholme DJ, Taratufolo MC *et al.*, 2012. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) isolates from recent bacterial canker of kiwifruit outbreaks belong to the same genetic lineage. *PLoS ONE* 7, e36518.
- McCann HC, Rikkerink EH, Bertels F *et al.*, 2013. Genomic analysis of the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* provides insight into the origins of an emergent plant disease. *PLoS Pathogens* 9, e1003503.
- Mhedbi-Hajri N, Hajri A, Boureau T *et al.*, 2013. Evolutionary history of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas axonopodis*. *PLoS ONE* 8, e58474.
- Milne I, Lindner D, Bayer M *et al.*, 2009. TOPAL1 v2: a rich graphical interface for evolutionary analyses of multiple alignments on HPC clusters and multi-core desktops. *Bioinformatics* 25, 126–7.
- Nei M, Gojobori T, 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution* 3, 418–26.
- Niño-Liu DO, Ronald PC, Bogdanove AJ, 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Molecular Plant Pathology* 7, 303–24.
- Rees-George J, Vanneste JL, Cornish DA *et al.*, 2010. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S–23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions. *Plant Pathology* 59, 453–64.
- Rozen S, Skaletsky HJ, 2000. PRIMER3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, eds. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ, USA: Humana Press, 365–86.
- Sarkar SF, Guttman DS, 2004. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1999–2012.
- Scortichini M, 1994. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. *Plant Pathology* 43, 1035–8.
- Shimodaira H, Hasegawa M, 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution* 16, 1114–6.
- Takikawa Y, Serizawa S, Ichikawa T, Tsuyumu S, Goto M, 1989. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: the causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 55, 437–44.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731–9.
- Templeton MD, Reinhardt LA, Collyer CA, Mitchell RE, Cleland WW, 2005. Kinetic analysis of the L-ornithine transcarbamoylase from *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* that is resistant to the transition state analogue (R)-Nδ-(N'-sulfodiiminophosphinyl)-L-ornithine. *Biochemistry* 44, 4408–15.
- Vanneste JL, 2013. Recent progress on detecting, understanding and controlling *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a short review. *New Zealand Plant Protection* 66, 170–7.
- Vanneste JL, Yu J, Cornish DA, 2010. Molecular characterisations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains isolated from the recent outbreak of bacterial canker on kiwifruit in Italy. *New Zealand Plant Protection* 63, 7–14.

- Vanneste JL, Poliakoff F, Audusseau C *et al.*, 2011. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit in France. *Plant Disease* 95, 1311.
- Vanneste JL, Yu J, Cornish DA *et al.*, 2013. Identification, virulence, and distribution of two biovars of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in New Zealand. *Plant Disease* 97, 708–19.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Figure S1 Leaf symptoms caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) on *Actinidia deliciosa* 'Hayward' 20 days after inoculation

with Psa biovar 4 strain CFBP 7812 (a) and with Psa biovar 3 strain CFBP 7906 (b).

Table S1 Origin of the strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated in France from *Actinidia* spp. from 2010 to June 2013.

Table S2 List of PCR primers used in this study.

Table S3 Utilization of 95 carbon sources by six French strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) using Biolog GN MicroPlate (Biolog). Grey highlight indicates carbon sources that distinguish Psa biovar 3 (b3) from Psa biovar 4 (b4).

Table S1. Leaf symptoms caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) on *Actinidia deliciosa* ‘Hayward’ 20 days after inoculation with Psa biovar 4 strain CFBP 7812 (a) and with Psa biovar 3 strain CFBP 7906 (b).

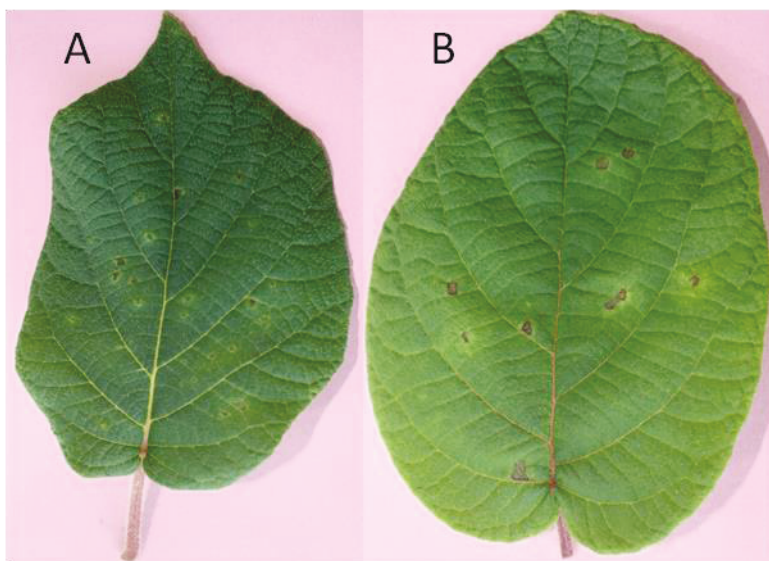


Table S2. Origin of the strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated in France from *Actinidia* spp. from 2010 to June 2013

Biovar	Host				Tissue				Region			Total
	<i>A. deliciosa</i>	<i>A. chinensis</i>	<i>A. arguta</i>	<i>A. sp</i>	Leaf	Wood	Flower bud	Root	Southeast	Southwest	Northwest	
3	197	47	1	3	150	93	3	2	49	192	7	248
4	31	0	0	1	32	0	0	0	0	9	23	32

Table S2 List of PCR primers used in this study

Gene target	Primer name	Primer sequence (5'-3')	T _m (°C)	Source
ITS	F1	TTTTGGCTTTGCACACCCCGATTTT	65	Rees Georges <i>et al.</i> 2010
	R2	TTTTGGCTTTGCACACCCCGATTTT		
OmpP1	Koh&Nou F	CACGGATACATGGGCTTATGC	63	Koh&Nou, 2002
	Koh&Nou R	CTTTTCATCCACACACTCCG		
avrD	AvrDdpx-F	TTTCGGTGGTAAAGTTGGCA	63	Gallelli <i>et al.</i> , 2011
	AvrDdpx-R	TTCCGGCTAGGTGAAAAATGGG		
Coronatine	CFLF	GGCGCTCCCTCGCACIT	67	Bereswill <i>et al.</i> , 1994
	CFLR	GGTATTGGCGGGGGTGC		
Arginine	ArgKF3	TCCCCCGGGAGGAAATTC AATGAAGATTA	55	Templeton <i>et al.</i> , 2005
	ArgKR	AACTGCAGTCAGGGGACGACTGTCTC		
BOX	BOXAIR	CTACGGCAAAGCGACCTGACG	53	Louws <i>et al.</i> , 1994
<i>gapA</i>	gapA-Fps	CGCCATYCGCAACCCG	64	Sarkar & Guttman, 2004
	gapA-Rps	CCCA YTCGTTGTCGTACCA		
<i>gltA</i> or <i>cts</i>	<i>cts</i> -Fs	CCCGTCGAGCTGCCAATWCTGA	59	Sarkar & Guttman, 2004
	<i>gltA</i> -1130s	CGAAGATCACCGGTGAACATGCTGG		
<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> +271ps	TCBGRGCVGARGTSATCATGAC	64	Hwang <i>et al.</i> , 2005
	<i>gyrB</i> -1022ps	TTGTCTYTTGGTCTGSGAGCTGAA		
<i>rpoD</i>	<i>rpoD</i> +364s	GYGAAAGGCGARATYGRAATCG	64	Hwang <i>et al.</i> , 2005
	<i>rpoD</i> -1222ps	CCGATGTGCGCTTCTCTGGATCAG		
<i>gapA</i>	gapA-F2	CACCGTGGAGTGTGACAAAAG	59	This study
	gapA-R2	GCGCCAGACAGTTGTCCA		

Table S3. Utilization of 95 carbon sources by six French strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) using Biolog GN MicroPlate (Biolog). Grey highlight indicates carbon sources that distinguish Psa biovar 3 (b3) from Psa biovar 4 (b4).

	CFBP7906	CFBP7910	CFBP8043	CFBP7908	CFBP7951	CFBP8161
Carbon sources	Psa b3	Psa b3	Psa b4	Psa b4	Psa b4	Psa b4
α -Cyclodextrin	-	-	-	-	-	-
Dextrin	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-
Tween 40	-	-	+	+	+	+
Tween 80	-	-	+	+	+	+
N-Acetyl-D-Galactosamine	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl-D-Glucosamine	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+
D-Arabitol	+	+	+	+	+	+
D-Cellobiose	-	-	-	-	-	-
i-Erythritol	-	-	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+
L-Fucose	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	+	+	+	+	+
Gentiobiose	-	-	-	-	-	-
α -D-Glucose	+	+	+	+	+	+
m-Inositol	+	+	+	+	+	+
α -D-Lactose	-	-	-	-	-	-
Lactulose	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	-	-	-	-	-	-
β -Methyl-D-Glucoside	-	-	-	-	-	-
D-Psicose	-	-	-	-	-	-
D-Raffinose	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	+	+	+	+	+	+

Sucrose	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	-	-	-	-	-	-
Turanose	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-
Pyruvic Acid Methyl Ester	+	+	+	+	+	+
Succinic Acid Mono-Methyl Ester	+	+	+	+	+	+
Acetic Acid	+	+	+	+	+	+
Cis-Aconitic Acid	+	+	+	+	+	+
Citric Acid	+	+	+	+	+	+
Formic Acid	W	W	W	W	W	W
D-Galactonic Acid Lactone	+	+	+	+	+	+
D-Galacturonic Acid	-	-	+	+	+	+
D-Gluconic Acid	+	+	+	+	+	+
D-Glucosaminic Acid	+	+	+	+	+	+
D-Glucuronic Acid	+	+	+	+	+	+
α -Hydroxybutyric Acid	-	-	-	-	-	-
β -Hydroxybutyric Acid	-	-	+	+	+	+
γ -Hydroxybutyric Acid	-	-	-	-	-	-
p-Hydroxy-phenylacetic Acid	-	-	-	-	-	-
Itaconic Acid	-	-	-	-	-	-
α -Ketobutyric Acid	-	-	+	+	+	+
α -Ketoglutaric Acid	-	-	+	+	+	+
α -Ketovaleric Acid	-	-	-	-	-	-
D,L-Lactic Acid	-	-	-	-	-	-
Malonic Acid	W	W	W	W	W	W
Propionic Acid	+	+	+	+	+	+
Quinic Acid	+	+	+	+	+	+
D-Saccharic Acid	+	+	+	+	+	+
Sebacic Acid	-	-	-	-	-	-
Succinic Acid	+	+	+	+	+	+
Bromosuccinic Acid	+	+	+	+	+	+
Succinamic Acid	+	+	+	+	+	+
Glucuronamide	-	-	-	-	-	-

L-Alaninamide	+	+	+	+	+	+
D-Alanine	+	+	+	+	+	+
L-Alanine	+	+	+	+	+	+
L-Alanyl-Glycine	+	+	+	+	+	+
L-Asparagine	+	+	+	+	+	+
L-Aspartic Acid	+	+	+	+	+	+
L-Glutamic Acid	+	+	+	+	+	+
Glycyl-L-Aspartic Acid	-	-	-	-	-	-
Glycyl-L-Glutamic Acid	+	+	+	+	+	+
L-Histidine	-	-	+	+	+	+
Hydroxy-L-Proline	-	-	-	-	-	-
L-Leucine	-	-	+	+	+	+
L-Ornithine	W	W	W	W	W	W
L-Phenylalanine	-	-	-	-	-	-
L-Proline	+	+	+	+	+	+
L-Pyroglutamic Acid	+	+	+	+	+	+
D-Serine	-	-	-	-	-	-
L-Serine	+	+	+	+	+	+
L-Threonine	W	W	W	W	W	W
D,L-Camitine	-	-	-	-	-	-
γ-Aminobutyric Acid	+	+	+	+	+	+
Urocanic Acid	-	-	-	-	-	-
Inosine	+	+	+	+	+	+
Uridine	W	W	-	-	-	-
Thymidine	-	-	-	-	-	-
Phenylethyl-amine	-	-	-	-	-	-
Putrescine	-	-	-	-	-	-
2-Aminoethanol	-	-	-	-	-	-
2,3-Butanediol	-	-	-	-	-	-
Glycerol	+	+	+	+	+	+
D,L,α-Glycerol Phosphate	-	-	-	-	-	-
α-D-Glucose-1-Phosphate	-	-	-	-	-	-
D-Glucose-6-Phosphate	-	-	-	-	-	-

2. Identification de l'origine de l'épidémie de *Psa* biovar 3 en France par MLVA

2.1. Résumé de l'article

2.1.1. Introduction

L'analyse de la diversité et la structure des populations d'agents pathogènes émergents peut donner des informations clés sur le mode de propagation et l'origine des introductions de l'agent pathogène, permettant *in fine* la mise en place d'une surveillance optimale. Les outils de géotypages, tel que la MLVA, permettent d'obtenir de telles informations.

L'objectif des travaux présentés dans le papier ci-après était de développer un schéma MLVA permettant de retracer les routes de l'épidémie et d'identifier l'origine de l'introduction de *Psa* et de *Psaf* en France. L'hypothèse de départ pour l'origine de l'épidémie de *Psa* biovar 3 en France était que la bactérie aurait été introduite via des plants contaminés importés d'Italie. Le set de VNTRs a été développé de façon pouvoir explorer la diversité de souches isolées dans les différents pays contaminés (Italie, Nouvelle-Zélande, Chili et Chine), et qu'il puisse être utilisé *a posteriori* par ces pays sur une plus large collection de souches afin d'acquérir plus d'information sur les origines des introductions.

2.1.2. Méthodologie

La collection de souches (381 au total) incluait : *Psa* biovar 1 isolée au Japon (1) ; *Psa* biovar 2 isolée en Corée (1) ; *Psa* biovar 3 (340 au total) isolées en France (264), en Italie (53), en Nouvelle-Zélande (12), au Chili (3) et en Chine (8) ; *Psaf* (39 au total) isolées en France (29), en Nouvelle-Zélande (7) et en Australie (3).

L'analyse phylogénique des souches isolées en Chine a été réalisée par MLSA, comme présenté dans l'article précédent (Chapitre II.1).

L'identification *in silico* des VNTRs a été faite en appliquant le logiciel Tandem Repeats Finder au génome d'une souche de *Psa* biovar 3 isolée en Italie (ICMP18744) et d'une souche de *Psaf* (ICMP18807), dont les séquences étaient disponibles sur Genbank. Des amorces ont été dessinées sur les régions flanquant les répétitions en tandem et testés en PCR avec électrophorèse sur gel d'agarose sur un panel de 8 souches (*Psa* biovars 1, 2 et 3 et *Psaf*). Les VNTRs retenus ont ensuite été testés sur la collection de souches, en étiquetant le

primer « forward » d'un fluorochrome permettant la révélation des produits d'amplification par électrophorèse à capillaires.

L'analyse des résultats du génotypage a été réalisée en convertissant les tailles des régions répétées en nombre de répétitions. Les relations phylogénétiques entre les souches et la structuration des populations ont été inférées en construisant un « minimum spanning tree » (arbre de recouvrement minimal catégorique) avec le logiciel BioNumerics. La structuration des populations a également été évaluée par une méthode multivariée (DAPC).

2.1.3. Résultats et discussion

L'étude phylogénétique a permis d'assigner les souches de *Psa* biovar 3 isolées en Chine au sein du cluster de *Psa* biovar 3 isolées dans les autres pays et confirmer l'évolution clonale de ce biovar par MLSA.

Un set de 64 VNTRs potentiels a été trouvé à partir de l'analyse *in silico* des génomes. Parmi ces 64 VNTRs testés en PCR sur un set de 8 souches représentatives des trois biovars de *Psa* et de *Psaf*, 13 ne génèrent pas d'amplicon, 40 étaient monomorphes et 11 étaient polymorphes. Le séquençage des régions bordant les répétitions des 11 VNTRs retenus a permis de révéler de la variation de taille pour un VNTR pour *Psa* biovars 1 et 2 et *Psaf*, mais pas pour *Psa* biovar 3. Ce VNTR a uniquement été conservé pour l'analyse des souches de *Psa* biovar 3.

Le set de 10 VNTRs a structuré les biovars et pathovars en accordance avec la structuration obtenue par MLSA et 64 haplotypes ont été distingués parmi les 381 souches. Les résultats du génotypage des 340 souches de *Psa* biovar 3 ont permis de distinguer 55 haplotypes et les souches isolées en Chine présentaient le plus de diversité (7 haplotypes pour 8 souches). Les souches se structuraient en fonction de leur origine géographique, à l'exception de trois souches italiennes groupant avec des souches isolées en France. La majorité des souches isolées en France (156 sur 264) partagent le même haplotype, incluant deux des trois souches italiennes. Cet haplotype majeur étant entouré par le plus grand nombre d'haplotypes ne différant que par un locus et incluant des souches isolées en France et en Italie, a été identifié comme le fondateur de l'épidémie de *Psa* en France. Les résultats de l'analyse statistique (DAPC) ont montré que les souches isolées en France et en Italie sont génétiquement liées.

Psa biovar 3 a été détecté en Europe pour la première fois en Italie en 2008 et deux ans plus tard en France. Depuis les années 2000 de nombreux plants de kiwi ont été importés

d'Italie vers la France. Ces éléments ont permis d'établir l'hypothèse suivante quant à l'origine de l'épidémie en France : *Psa* biovar 3 serait arrivé en France via l'importation de plants contaminés en provenance d'Italie. Les résultats de la MLVA et de la DAPC sont congruents avec cette hypothèse.

Seulement quatre VNTRs sur les 10 de départ généraient du polymorphisme au sein des souches de *Psaf*. La MLVA menée avec ces quatre VNTRs a structuré les 39 souches au sein de 16 haplotypes et selon leur origine géographique. Cependant aucune structuration évidente n'a été identifiée et la structuration par MLVA ne suit pas la structuration en quatre lignées observée par MLSA, ce qui pourrait être la conséquence du phénomène d'homoplasie. Le set de VNTRs n'est pas suffisant pour inférer les relations entre les souches de *Psaf* et il convient de l'améliorer en ajoutant des VNTRs et de les appliquer indépendamment pour chaque lignée.

2.1.4. Conclusion

Nous avons développé un schéma MLVA adapté pour explorer la diversité au sein des souches de *Psa* biovar 3 et qui pourra être utilisé dans d'autres pays afin de retracer l'origine des épidémies. Cette étude nous a également permis d'identifier l'origine géographique de l'épidémie en France, l'Italie, et le mode de propagation le plus probable est l'échange de matériel végétal infecté.

2.2. Publication

1 The origin of the outbreak in France of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3, the
2 causal agent of bacterial canker of Kiwifruit, revealed by a Multilocus Variable-number of
3 Tandem Repeat Analysis.

4

5

6 A. Cuntty^{1,2}, S. Cesbron¹, F. Poliakoff², M-A. Jacques¹, C. Manceau^{2*}.

7 ¹ UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, SFR 4207 Quasav, Institut
8 National de la Recherche Agronomique, Beaucouzé, France. ²Laboratoire de la santé des
9 végétaux, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du
10 travail, Angers, France.

11 *corresponding author: charles.manceau@anses.fr

12

13 **Keywords**

14 MLSA, VNTR, MLVA, DAPC, *P. s.* pv. *actinidifoliorum*

15

16 **Running title**

17 MLVA to track *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

18

19 **Abstract**

20

21 The first outbreaks of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv.
22 *actinidiae* (*Psa*) biovar 3 were detected in France in 2010. *Psa* causes leaf spots, dieback, and
23 canker that sometimes lead to the death of the vine. *Pseudomonas syringae* pv.
24 *actinidifoliorum* (*Psaf*), which is pathogenic on kiwi as well, causes only leaf spots. In order
25 to conduct an epidemiological study to track the spread of the epidemics of these two
26 pathogens in France we developed a Multilocus Variable-Number of Tandem Repeats
27 (VNTR) Analysis (MLVA). MLVA was conducted on 340 strains of *Psa* biovar 3 isolated in
28 Chile, China, France, Italy and New Zealand, and on 39 strains of *Psaf* isolated in Australia,
29 France and New Zealand. Eleven polymorphic VNTR loci were identified in the genomes of
30 *Psa* biovar 3 ICMP 18744 and of *Psaf* ICMP 18807. MLVA enable the structuring of *Psa*
31 biovar 3 and *Psaf* strains in 55 and 16 haplotypes, respectively. MLVA and Discriminant
32 Analysis of Principal Components revealed that strains isolated in Chile, China and New
33 Zealand are genetically distinct from *Psa* strains isolated in France and in Italy, which appear
34 to be closely related at the genetic level. In contrast, no structuring was observed for *Psaf*. We
35 developed a MLVA scheme to explore the diversity within *Psa* biovar 3 and to trace dispersal
36 routes of epidemic *Psa* biovar 3 in Europe. We suggest using this MLVA scheme to trace the
37 dispersal routes of *Psa* at a world level

38

39 **Introduction**

40 Agricultural systems are continuously afflicted by emerging infectious diseases (1), which can
41 have significant agronomic and economic consequences. Thorough knowledge of the causal
42 agent (propagation and contamination pathways, suitable environmental conditions, host
43 range and pathogenicity) is essential for determining and implementing efficient disease-
44 management measures. Pathogen genotyping yields precious information for understanding
45 the diversity and population structure of the bacterial organisms responsible for outbreaks. It
46 enables hypothesis about the dispersion routes of bacterial populations or clonal lineages
47 involved in epidemics. Multilocus Variable-Number of Tandem Repeats (VNTR) Analysis
48 (MLVA) (2) is a powerful and portable genotyping method. It has been demonstrated that
49 MLVA has a higher sensitivity and resolution than any other genotyping methods such as
50 PFGE and MLST applied for an in-depth study of bacteria populations or epidemic outbreaks
51 (3, 4). The aim of MLVA is to use PCR to target the tandem repeats with a motif of more than
52 five nucleotides and to analyze the variability of their pattern in order to discriminate isolates.
53 Generally, VNTR loci evolve according to the stepwise mutation model (SMM) by gain or
54 loss of a single repeat. The evolution of a VNTR is mainly the consequence of DNA
55 polymerase slippage but can also be due to recombination events between repetitions. Large
56 gain or loss of repeats may occasionally occur within VNTR following single-step mutation
57 model (SSM) indicating recombination events (3, 4, 5). Nowadays, the sequencing of
58 bacterial genomes facilitates the identification of VNTR loci by means of dedicated
59 algorithms and adequate tools such as Tandem Repeats Finder (6) or mreps (7). MLVA was
60 used in an epidemiological survey to trace the routes of *Haemophilus influenza* outbreaks (8)
61 or *Bacillus anthracis* (2, 9) outbreaks. MLVA was applied to monomorphic plant pathogenic
62 bacteria belonging to different genus and species such as *Xylella fastidiosa* (10),
63 *Xanthomonas citri* (11), *Ralstonia solanacearum* (12), *Candidatus liberibacter asiaticus* (13),

64 *Erwinia amylovora* (14) and *Xanthomonas arboricola* pathovars (15). MLVA was first
65 applied on *Pseudomonas syringae* by Gironde and Manceau (16) and provided new insights
66 into host specificity of *P. syringae* pathogenic on brassicaceous and solanaceous plants.

67 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*), the causal agent of bacterial canker of kiwifruit
68 (*Actinidia* spp.) is considered to be a pandemic pathogen and has been isolated around the
69 world over the last thirty years (17, 18). Vanneste *et al.* (18) suggested classifying these
70 strains into three biovars: biovar 1, biovar 2, biovar 3 according to phenotypic, pathogenic and
71 genomic features. Strains of *Psa* biovar 1 were isolated in Japan in 1984 and Italy in 1992 (19,
72 20) and strains of *Psa* biovar 2 in Korea in 1994 (21). *Psa* biovar 3 was first reported in China
73 (22) and more recently in Italy in 2008 (23, 24). It was then observed elsewhere in Europe
74 (France and Portugal (2010) ; Turkey, Switzerland and Spain (2011) ; Germany and Slovenia
75 (2013) ; and in Greece (2014) (18, 25, 26, 27)) and outside Europe in New Zealand and Chile
76 (18). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* (*Psaf*) caused only necrotic symptoms on
77 leaves (28); strains of this pathovar were previously described as *Psa* biovar 4 (18). *Psaf* was
78 isolated in New Zealand (18), Australia (29) and in France in 2011 (28). Two lineages of *Psaf*
79 were first described in New Zealand strains (30). Recent studies have revealed the presence of
80 this pathovar in France with higher polymorphism, based on the analysis of four
81 housekeeping genes two additional lineages were reported (28).

82 Although analyses based on the core genome showed that *Psa* biovar 3 strains responsible for
83 the current worldwide outbreaks are monophyletic, genomic analyses based on the accessory
84 genome revealed diversity within these strains (30, 32, 33). *Psa* biovar 3 strains are
85 monophyletic independently of their geographical origin, when analyzed by MLSA conducted
86 on housekeeping genes (28, 31). Composition of genomic islands in *Psa*, such as integrative
87 and conjugative element (ICE) carrying genes involved in pathogenicity, revealed that strains

88 isolated in Europe are very similar to each other and that epidemics in Europe may have a
89 different source population than epidemics in New Zealand or Chile (30, 32, 33).

90 The aims of this study were: i) to set up a tool to characterize the genetic structure of
91 pathogens causing diseases in kiwifruit, ii) to gain further insight into the global diversity and
92 population structure of *Psa* biovar 3, which is responsible of a worldwide epidemic, iii) to
93 identify the origin of the *Psa* outbreak in France. An MLVA scheme with 11 VNTRs was
94 applied to a collection of 264 strains of *Psa* biovar 3 and 29 strains of *Psaf* isolated in France
95 and to sets of strains of *Psa* biovar 3 and *Psaf* isolated in Australia, China, Italy and New
96 Zealand. Based on this scheme, *Psa* strains isolated in France and in Italy were found to be
97 genetically closely related.

98

99 **Materials and methods**

100 **Bacterial strains collection and DNA extraction.**

101 Overall, two hundred and sixty four strains of *Psa* biovar 3 and 29 strains of *Psaf*, isolated
102 from leaves, canes, flower buds and roots of *A. deliciosa* or *A. chinensis* from different
103 regions in France during the surveys conducted from 2010 to 2013 (28), were included in this
104 study (Table 1). An additional 76 strains of *Psa* biovar 3, one strain of each biovar 1 and 2,
105 and 10 strains of *Psaf* strains isolated outside of France were included in our collection (Table
106 1). Among these *Psa* biovar 3 strains, eight strains were initially isolated in China (AHPP1,
107 GC31, HWD3, JF8, JZGMC1, SCHY9, SH8 and WT2) from leaf necrotic spots on four
108 plants species (*A. deliciosa*, *A. chinensis*, *Paulownia fortunei*, *Alternanthera philoxeroides*)
109 and from one insect (*Philagra sp*), in five Chinese provinces (Anhui, Guizhou, Shanghai,
110 Shaanxi, and Sichuan) (Table 1). Samples from plants other than kiwifruit were collected in
111 the vicinity of symptomatic kiwifruit orchards and the insect was collected on a diseased

112 kiwifruit vine. Bacteria were maintained on KBC-ba agar plates (28) and stored at -80°C in
113 20% glycerol.

114 Bacterial strains were grown on KBC-ba agar plates at 25 °C for 24 h. Single colonies were
115 suspended in sterile distilled water, and bacterial suspensions were adjusted to 1×10^6 CFU
116 ml^{-1} . Aliquots (1.5 mL bacterial suspension) were heated at 100°C for 15 min. The bacterial
117 lysates were then centrifuged at 10,000 g for 10 min to obtain a clear nucleic acid-containing
118 supernatant. The supernatant samples were stored at -20 °C until further analysis.

119

120 **Multilocus Sequence Analysis.**

121 In order to study the phylogeny of the eight strains isolated in China, a Multilocus Sequence
122 Analysis (MLSA) was conducted on these eight strains and a set of eight *Psa* and five *Psaf*
123 strains representative of the phylogenetical lineages previously described (28). Partial
124 sequences of four housekeeping genes, *gapA*, *gltA* (also known as *cts*), *gyrB*, and *rpoD*, which
125 code for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, citrate synthase, DNA gyrase B and
126 sigma factor 70, respectively, of the eight strains of *Psa* isolated in China were amplified
127 using primers designed by Sarkar & Guttman (34) and Hwang *et al.* (35). PCRs were carried
128 out as previously indicated (28). The two strands of the PCR products were sequenced by
129 Genoscreen (Lille, France). Sequence analyses were performed using Geneious 8.0.4 software
130 (Biomatters; Auckland, New Zealand) and the BioEdit program (36). The partial sequences of
131 the PCR products were deposited in GenBank under the accession number KP677392 to
132 KP677423.

133 The sequences were concatenated according to the alphabetic order of the gene. The
134 concatenated data set was 3159-bp long (*gapA* from bp 1 to 675, *gltA* from 676 to 1671, *gyrB*
135 from 1672 to 2346, *rpoD* from 2347 to 3159). A Neighbor-Joining tree was built with the
136 MEGA 5.1 program using the Jukes-Cantor distance methods with the DNA sequences for the

137 four housekeeping genes. The *P. syringae* pv. *tomato* CFBP 2212 strain was included as an
138 outgroup to root the tree and bootstrap analyses were done with 1 000 replicates. The tree was
139 visualized with the MEGA 5.1 program.

140

141 **VNTR loci extraction, primer design and PCR amplification.**

142 *In silico* detection of VNTR loci was done by analyzing the genomic sequences of the *Psaf*
143 strain ICMP 18807 and *Psa* strain ICMP 18744 available on NCBI (Bioprojects
144 PRJNA199894 and PRJNA199875) with the Tandem Repeats Finder program
145 (<http://tandem.bu.edu>) using the following parameters: region length of 30 to 1 000 bp, unit
146 length of 5 to 12 bp, at least six tandem repeats (TR) and a similarity of at least 80% among
147 the repeats. Primers were designed in the TR flanking region of each VNTR loci retained with
148 Primer3 software (37) to generate amplicons of less than 450 bp. VNTRs were named
149 according to the contig (numerical number) and the strain numbers (I or II corresponding to
150 *Psaf* strain ICMP 18807 or *Psa* strain ICMP 18744, respectively) (Table 2), on which they
151 were found.

152 The potential VNTR loci were first amplified in simplex PCR carried out in a final volume of
153 20 μ l containing 0.25 U of GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega, Fitchburg, WI, USA),
154 1X of colorless GoTaq Flexi buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 62.5 μ M of each deoxynucleotide
155 phosphate, 0.125 μ M of each primer (Table 2) and 1 μ l of boiled extract. PCRs were
156 performed on a Veriti® 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France)
157 using a thermal cycling program (5 min at 95°C followed by 32 cycles of 30 s at 95°C and 30
158 s at T_m) (Table 2), and ended at 72°C for 10 min. PCR products were separated by horizontal
159 1.5% agarose gel electrophoresis in TBE buffer and staining with ethidium bromide (5
160 μ g/ml). The DNA bands were visualized with Gel Doc™ XR+ Imager (Bio-Rad) and the

161 amplicon size was estimated using the 100-bp DNA Molecular-Weight Marker XIV (100-bp
162 ladder) (Roche Applied Science).

163 The VNTRs retained after agarose gel electrophoresis were labeled using labeled primers with
164 a fluorescent dye at the 5' end: F for 6-FAM, P for PET, H for HEX and N for NED (Table
165 2). The PCRs were performed under the same conditions as described above. Amplified
166 products were diluted to 1/8 with sterile distilled water. Then 2.5 μ l aliquots were mixed with
167 9.45 μ l of Hi-Di formamide (Sigma-Aldrich, Saint Quentin, France) and 0.15 μ l of Genscan
168 500 Liz internal line size standard (Applied Biosystems). Capillary electrophoreses were
169 performed using an ABI PRISM 3130 platform (ANAN platform of the SFR Quasav, Angers,
170 France).

171

172 **Multilocus VNTR Analysis genotyping.**

173 The output data from capillary electrophoresis were processed in order to assess repeats
174 number of each VNTR using Geneious 8.0.4 software (Biomatters). The size of the flanking
175 region for each VNTR was identified and the size of the tandem repeat was converted into a
176 repeat number (Table 3). The amplicons of each VNTR generated by the ICMP 18807 and
177 ICMP 18744 strains were sequenced in order to verify that the calculated number of tandem
178 repeats indeed corresponded to actual sequence length.

179

180 **Bioinformatic analysis.**

181 The phylogenetic relation between the strains was inferred using a minimum spanning tree
182 (MST) with BioNumerics (version 6.5; Applied Maths, St-Martens-Latem, Belgium). The
183 MST was generated using the categorical coefficient and the maximum number of single-
184 locus variants as a priority rule. Equal weight was assigned to each VNTR. Clonal complexes
185 grouped Single Locus Variants (SLV), *e.g.* haplotypes that differed from one another by only

186 one locus. Simpson's index of diversity (38) ranging from 0 to 1 and allelic richness, were
187 calculated using BioNumerics (version 6.5; Applied Maths) and FSTAT 2.9.3 ([http://](http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm)
188 <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>) (39), respectively, in order to assess the
189 discriminatory power for each VNTR.

190 The genetic population structure of *Psa* biovar 3 and *Psaf* was analyzed using a Discriminant
191 Analysis of Principal Components (DAPC), a clustering method without *a priori*, which did
192 not make any assumption as to the population genetic models (40). The optimal number of
193 clusters was determined by running *k*-means with increasing values of *k* and comparing the
194 different clustering solutions using the Bayesian Information Criterion (BIC) (40). The value
195 of *k* related to the lowest value of BIC is ideally the optimal number of clusters. This analysis
196 was performed using the 'adegenet' package in R (40).

197

198 Results

199 Strains of *Psa* biovar 3 isolated from various plants and an insect are monomorphic in

200 Multilocus Sequence Analysis.

201 The eight *Psa* strains isolated in China clustered within the lineage that groups exclusively
202 *Psa* biovar 3 strains isolated during the latest outbreaks (in France: CFBP 8047, CFBP 8063,
203 CFBP 8064; in New Zealand: CFBP 7811; and in Italy: CFBP 7287) (Fig. 1). This clustering
204 is supported by a strong bootstrap value (99%). These strains of *Psa* biovar 3 isolated in
205 China presented the same biochemical features as the other *Psa* biovar 3 strains (data not
206 shown), while these strains were isolated from five different organisms (four plants species:
207 *Actinidia deliciosa*, *A. chinensis*, *Paulownia fortunei* and *Alternanthera philoxeroides*, and
208 one insect: *Philagra sp*) and in five different regions (Anhui, Guizhou, Schaanxi, Shanghai
209 and Sichuan) (Table 1). They all grouped in a single lineage based on MLSA.

210

211 **Multilocus VNTR analysis on a worldwide collection of *Psa* and *Psaf*.**

212 *In silico* analysis of the genomic sequences of the *Psaf* strain ICMP 18807 and *Psa* strain
213 ICMP 18744 led to the finding of 64 potential VNTR loci. These 64 VNTRs were first tested
214 on a set of eight strains representative of *Psa* biovar 1 (CFBP 4909), biovar 2 (ICMP 19071),
215 biovar 3 (CFBP 8050, CFBP 8051) and *Psaf* (CFBP 7951, CFBP 8043, CFBP 8050, CFBP
216 8051). Thirteen VNTRs did not generate an amplicon for all pathovars, forty VNTRs were
217 monomorphic for all pathovars and only eleven VNTRs were polymorphic. The final set of
218 polymorphic VNTRs retained for MLVA consisted of four VNTRs designed on the genome
219 sequence of *Psaf* strain ICMP 18807 and seven VNTRs designed on the genome sequence of
220 *Psa* ICMP 18744 (Table 2).

221 The flanking sequences of the 11 VNTRs were analyzed *in silico* from the genomic resources
222 of *Psa* and *Psaf* strains available on public databases. The analysis revealed that the flanking
223 regions were well conserved for all VNTRs, except for the VNTR TR2II. Insertions were
224 detected in the VNTR TR2II flanking regions for strains of *Psa* biovar 1, *Psa* biovar 2 and
225 *Psaf*, but not for *Psa* biovar 3. Thus, VNTR TR2II was only used to explore the diversity of
226 *Psa* biovar 3 strains.

227 The global minimum spanning tree (MST) (Fig. 2) revealed the ability of the set of the ten
228 VNTRs (all excepted VNTR TR2II) to discriminate *actinidia* and *actinidifoliorum* pathovars,
229 and biovars 1, 2 and 3 within *Psa*. Among the 381 *Psa* and *Psaf* strains analyzed, 64
230 haplotypes were revealed. The pathovar *actinidifoliorum* differed from *Psa* at six VNTR loci.
231 Biovar 1 differed from biovar 2 at four VNTR loci and was distinguished from biovar 3 by
232 seven VNTR loci.

233

234 **Multilocus VNTR analysis on *Psa* biovar 3.**

235 The genetic polymorphism revealed by the MLVA scheme was linked to the geographical
236 origin of the strains. All the 11 VNTRs were polymorphic for the 340 *Psa* biovar 3 strains.
237 The polymorphism of each VNTR varied from two to 11 haplotypes and the higher
238 polymorphic VNTRs were TR10I, TR39II and TR19II, which generated 11, nine and seven
239 haplotypes, respectively (Table 3). The values of Simpson's index varied from 0.01 to 0.47
240 and allelic richness values ranged from 1.43 to 7.43 (Table 3). The allelic richness differed
241 according to the geographical origin of the strains. The strains isolated in China showed the
242 highest allelic richness values for eight of the 11 VNTRs. The VNTRs' allele frequencies
243 were evaluated for each geographical origin of the *Psa* biovar 3 strains (Fig. 3 A). Strains
244 isolated in Italy and in France showed clearly different allele frequencies only at VNTR
245 TR2II. Strains isolated in Europe differed from strains isolated in New Zealand and Chile at
246 VNTRs TR10I, TR2II and TR39II. The 12 strains isolated in New Zealand are genetically
247 homogeneous. The three strains isolated in Chile were also genetically homogeneous and
248 differed by only one locus (TR39II) from strains isolated in New Zealand. Strains isolated in
249 Europe and in New Zealand differed from strains isolated in China at VNTRs TR10I, TR30I,
250 TR19II, TR39II and TR64II. All strains isolated in China had a single original haplotype at
251 VNTR loci TR30I, the allele 1 corresponding to one repeat (Fig. 3 A and Table S1).

252 A total of fifty-five haplotypes were distinguished by pooling the genotyping data of the 11
253 VNTRs (Table 1). The relationships identified between the haplotypes and the geographical
254 origin of the strains, are shown in the MST (Fig. 4 A). The eight strains isolated in China
255 produced seven unique different haplotypes. Specific haplotypes gathered strains from New
256 Zealand and Chile. Among the 53 strains isolated in Italy, three strains (CFBP 7286, ICMP
257 18744 and CFBP 7287) shared two haplotypes with 164 strains isolated in France (Fig. 4 A),
258 and 12 different haplotypes were distinguished within the 50 other strains isolated in Italy.
259 Thirty-four haplotypes were found within the 264 strains isolated in France.

260 One haplotype was identified as the potential founder of the recent epidemics in Europe. *Psa*
261 biovar 3 strains formed one clonal complex, two doubletons and four singletons. The main
262 clonal complex included all strains isolated in France, 51 strains isolated in Italy and all
263 strains isolated in New Zealand and in Chile. In the center of this clonal complex, the
264 haplotype n°55 (Table 1) grouped the majority of strains (156 strains) isolated in France and
265 the strains CFBP 7286 and ICMP 18744 isolated in Italy, exhibited the same haplotype (Fig. 4
266 A). It was the most frequent haplotype, which included 46.47% of *Psa* biovar 3 strains and
267 was surrounded by the largest number of SLVs, suggesting that it is the founder of the
268 epidemic in France. One singleton (haplotype n°37) included two strains isolated in Italy
269 (LSV 46.22 and LSV 46.23), which differed from the haplotype n°40 at two locus (TR15I and
270 TR30I) by two and one repetitions (Table S1), respectively. The two other doubletons and the
271 three other singletons are separated from the main one by at least four loci. They included all
272 strains isolated in China. This genetic distance precludes drawing conclusions about
273 genealogic links between strains isolated in China and Europe from our collection.

274 The MST did not split isolates from different plant species (*A. deliciosa*, *A. chinensis*, *A.*
275 *arguta*, *Actinidia sp.*, *Paulownia fortunei*, *Alternanthera philoxeroides*) into different
276 haplotypes. Strains from China were genetically highly diverse whatever the organism and
277 place of isolation. One clonal complex included the strains SH8 and WT2 isolated from *A.*
278 *chinensis* in Shanghai and from *P. fortunei* in Anhui, respectively. The other clonal complex
279 included strains AHPP1, HWD3 and JF8, isolated from various organisms in Anhui, Shaanxi
280 and Anhui, respectively. Three singletons each included one strain isolated in Chinese
281 provinces: Guizhou (GC31), Anhui (JZGMC1) and Sichuan (SCHY9). The strain isolated
282 from *Paulownia fortunei* was genetically closely related (only one differential locus) to the
283 strain SH8 isolated from *A. chinensis*. The strain JZGMC1 isolated from *Alternanthera*
284 *philoxeroides* was genetically closely related (only two differential loci) to strains isolated in

285 Italy from *Actinidia* sp. or in China (SCHY9) from *A. deliciosa*. The strain isolated from the
286 insect (AHPP1) is genetically closely related (only one differential locus) to two strains
287 (HWD3 and JF8) isolated from *A. deliciosa* and *A. chinensis*.

288

289 **Discriminant Analysis in Principal Components (DAPC) on *Psa* biovar 3 data.**

290 The DAPC lead to structure the 340 *Psa* biovar 3 strains in four clusters (Fig. 5), which were
291 plotted in the ordination space with the horizontal and vertical axis explaining 60% and 21%
292 of the total variability among clusters, respectively. The eigenvalues showed that the genetic
293 structure was captured by the first two principle components (Fig. 5). The horizontal axis
294 explained most of the total variability and distributed the four clusters into two groups. The
295 first group consisted of the clusters 2 and 3 including five strains isolated in China (AHPP1,
296 HDW3, JF8, SH8 and WT2), and three strains isolated in China (GC31, JZGMC1 and
297 SCHY9) and all the strains isolated in Chile and New Zealand, respectively. Clearly distant
298 on the horizontal axis, the second group gathered clusters 1 and 4, which both mixed strains
299 isolated in France and in Italy.

300

301 **Multilocus VNTR Analysis on *Psaf*.**

302 Among the set of 10 VNTRs only four (TR10I, TR14I, TR30I and TR19II) generated
303 polymorphism within *Psaf* strains (Table 3), while the other six VNTRs were monomorphic.
304 The polymorphism of these five VNTRs varied from two to 10 haplotypes, the higher
305 polymorphic VNTRs were TR10I and TR14I, which generated 10 and five haplotypes,
306 respectively. The Simpson's index and allelic richness values ranged from 0.05 to 0.90 and
307 from 2.00 to 10.00, respectively. The distribution of the allele frequencies for the four VNTRs
308 differed according to the geographical origin of the strains (Fig. 3 B), especially for VNTR
309 TR10I, which was specific to each of the three countries of origin of the strains.

310 No strains isolated in different geographic areas shared the same haplotype. A total of 16
311 haplotypes were revealed after pooling the genotyping data of the four VNTRs (Table 1). The
312 relationships identified between the haplotypes and the geographical origin of strains were
313 shown by the MST (Fig. 4 B). All strains isolated in Australia had the same haplotype. The
314 seven strains isolated in New Zealand were split in four haplotypes, and the 29 strains isolated
315 in France were split into 11 haplotypes. All haplotypes differed by one or two loci out of the
316 five polymorphic loci. One clonal complex grouped the strains isolated in all geographical
317 locations and two singletons characterized strains isolated in France. When running the DAPC
318 (data not shown), no clear clustering was found, suggesting that within our data set of strains
319 of *Psa* there is no evident population structure.

320

321 Discussion

322 The Multilocus VNTR Analysis scheme revealed high diversity within *Psa*

323 MLVA is an inexpensive resolving tool, which is widely used to study genetic diversity and
324 to deduce patterns of the spread of genetically monomorphic bacterial pathogens (41). Here,
325 we report on an MLVA-based genotyping scheme targeting 11 carefully-selected VNTRs for
326 surveillance of the genetically monomorphic *Psa* biovar 3 responsible for the recent outbreaks
327 of kiwifruit bacterial canker. The VNTR 2II has insertions, with variable length, in the
328 flanking region for strains of *Psa* biovar 1 and biovar 2. According to this information, we
329 propose to remove the VNTR 2II and to use a set of 10 VNTR adapted to reveal diversity
330 within biovars 1 and 2 (data not shown) for the surveillance of these biovars. .

331 Among the 11 VNTRs, nine were considered to be microsatellites (the tandem repeat motif is
332 about six to nine nucleotides) and two to be minisatellites (the tandem repeat motif is greater
333 than nine nucleotides) (Table 2 and Table 3) (3). Microsatellites are known to evolve faster
334 than minisatellites and to be more polymorphic (42). Here the most polymorphic VNTRs are

335 microsatellites as expected. MLVA is a highly resolutive method, which distinguish strains of
336 *Psa* biovar 3 from different origins. Various genomic analyses have concluded that *Psa* biovar
337 3 remains a highly monomorphic pathogen at the genomic level (30, 32, 33).

338

339 **The Multilocus VNTR Analysis scheme composed of 11 VNTRs made it possible to gain**
340 **further insight into the global diversity of the recent worldwide epidemic pathogen *Psa***
341 **biovar 3.**

342 The developed MLVA scheme made it possible to distinguish 55 haplotypes within 340
343 strains of *Psa* biovar 3. The 340 strains grouped into one clonal complex, two doubletons and
344 four singletons (Fig. 4 A) after using the classical criterion of one allelic mismatch. All the
345 strains isolated in Chile, France, New Zealand and 51 of the strains in Italy grouped into one
346 major clonal complex, and one singleton consisting of two strains isolated in Italy. The Italian
347 singleton (haplotype n°37) is a double locus variant of this major clonal complex such as the
348 closest singleton (haplotype n°4) that group strains isolated in China. Moreover, the major
349 clonal complex grouped almost all the haplotypes of *Psa* biovar 3 with a lot of
350 overrepresented haplotypes, which is a strong epidemiological signature of a recent
351 emergence of *Psa* biovar 3. The low genetic diversity revealed for *Psa* biovar 3 strains
352 isolated from Chile, France, Italy and New Zealand could be correlated with the status of the
353 emerging epidemic pathogen for *Psa* biovar 3 as described in the case of *Xanthomonas citri*
354 pv. *citri* in Viet Nam (43).

355 Strains of *Psa* biovar 3 presented in this study were sampled over four years since the
356 beginning of the outbreak in France (Table 1). This time lapse was long enough to generate
357 diversity within *Psa* biovar 3, but was not long enough to separate different genetic clusters or
358 clonal complexes according to their geographical origins.

359 More diversity was revealed among the eight strains isolated in China than among the three,
360 264, 53 and 12 strains isolated in Chile, France, Italy or New Zealand, respectively. This high
361 level of diversity observed within strains isolated in China indicates that they were sampled
362 from a pool of *Psa* biovar 3 strains with a longer period of diversification than strains isolated
363 in Europe, New Zealand or Chile. A thorough analysis of the diversity of *Psa* biovar 3 strains
364 in China would be useful to link the strains from China to those recently isolated in epidemics
365 outside China. This could support the hypothesis that the common ancestor of *Psa* biovar 3
366 strains could originate from China, which is the diversification area for kiwifruit as well (30,
367 32, 33, 44).

368 The structure of the *Psa* biovar 3 obtained in the MST (Fig. 4 A) was compared with the year
369 and the host of isolation of the strains isolated in Europe but no correlation was found (data
370 not shown). No *Psa* biovar 3 structuring was identified in our collection of strains isolated
371 from different organisms and different locations in China. Strains isolated from diverse
372 organisms in diverse provinces in China share the same haplotype (*i.e.* haplotype n°1), but
373 strains isolated from one host (*A. chinensis*), or from province (Anhui) are dispatched in
374 several haplotypes (*i.e.*, haplotypes n°1, n°3 and n°30; and haplotypes n°1, n°2, n°4, and n°29,
375 respectively).

376 We suggest that *Psa* biovar 3 is an intrapathovar subgroup highly virulent on *Actinidia* spp.
377 This subgroup would be widely distributed in China with epiphytic capacity which permits
378 the dispersion of bacterial cells in the plant canopy with the assistance of insects present on
379 leaf surface. The strains isolated from *Paulownia fortunei* and *Alternanthera philoxeroides*
380 were isolated from leaf necrotic spots. We do not have additional information about
381 pathogenicity of these strains on these plant species and we do not consider these plants as
382 reservoir or susceptible plants at that stage, but we would suggest that *Psa* biovar 3 could
383 develop epiphytically on aerial parts of other plants than *Actinidia* spp.

384

385 **Epidemics of *Psa* biovar 3 in France and in Italy share the same origin.**

386 The recent outbreaks in Chile, Europe and New Zealand could have three different origins
387 (33). In the present study we did not find any common haplotype for strains isolated in Chile,
388 China, France and New Zealand. In contrast, several strains isolated in Italy (CFBP 7286,
389 ICMP 18744 and CFBP 7287) displayed haplotypes that are identical to strains isolated in
390 France. One of this haplotype corresponds to the most frequent haplotype and is shared by
391 most of the strains from our collection isolated in Europe. As most SLVs are radially linked to
392 this central haplotype it may be proposed as the founder of this clonal complex as suggested
393 by Feil *et al.* (45). Furthermore, the haplotype n°37 grouped two strains isolated in Italy,
394 which are distant from the haplotype at two different loci (TR15I and TR30I) by two and one
395 repetitions, respectively. This represents just an additional evolutionary step (*i.e.* a mutation at
396 a locus whatever the mutation model retained) and the haplotype linking
397 haplotypes n°37 and n°40 is probably missing in the sample. The haplotype n°37 is related to
398 the clonal complex and belongs to the same "epidemic" population which would diverge more
399 in Italy than in France where it was be introduced earlier.

400 DAPC confirms that strains isolated in France and Italy, are genetically linked. The DAPC
401 clustering method grouped these strains in mixture into two clusters that are genetically
402 closely related and distinguishable from the two other clusters that include five strains isolated
403 in China (AHPP1, HDW3, JF8, SH8 and WT2), and three strains isolated in China (GC31,
404 JZGMC1 and SCHY9) and all the strains isolated in New Zealand and Chile, respectively.
405 This is in contrast to the results obtained with the MST, which showed that strains isolated in
406 Chile and New Zealand were genetically closer to strains isolated in Europe than to strains
407 isolated in China. The algorithm used to build MST assigned the same weight to each locus
408 whereas the algorithm implemented in DAPC give more weight to loci with more alleles. The

409 strains isolated in Chile and New Zealand shared two distinct alleles, which had only been
410 identified in strains isolated in China. This sharing of a rare allele could explain why the
411 strains isolated in Chile and New Zealand grouped preferentially with strains isolated in China
412 when analyzing with DAPC. The DAPC analysis provides complementary information to the
413 MST analysis in the determination of origin of epidemic populations in New-Zealand and
414 Chile. The use of MST and DAPC on MLVA data validate the hypothesis that the epidemics
415 observed in Europe, New-Zealand and Chile originated from China, independently. This
416 conclusion is in accordance with those withdrawn from SNP analysis (30, 32, 33).
417 French epidemic may originate in Italy through importation of infected plant for planting
418 material. *Psa* biovar 3 was first detected in Europe in Italy in 2008 (23, 24) and two years
419 later in France in 2010 (18). *Psa* has been registered by the European and Mediterranean Plant
420 Protection Organization (EPPO) in the A2 list of pests recommended for regulation as
421 quarantine pests
422 (http://www.uab.cat/Document/526/300/patogens_vegetals_quarantena_2012.pdf). The
423 exchange of contaminated plant material between countries generally favored the long-
424 distance spread of plant pathogenic bacteria (1). In November 2012, the Commission of the
425 European Union (EU) ordered surveys to assess the presence of *Psa* and set up measures to
426 limit its propagation. Consequently, pollen and plants originating from third countries (no EU
427 countries), must be accompanied by a *Psa*-free phytosanitary certificate to be imported in the
428 UE. *Psa*, as *Pseudomonas syringae* pathovars, has an epiphytic life on leaves (46, 47) and is
429 also systemic through the xylem vessels (48). The main pathway of dissemination of *Psa*
430 within and between orchards is the dispersal of bacterial exudates, oozing from cankers,
431 favored by wind and rain (49). Agronomical techniques, which induce wounds, can favor the
432 propagation of the disease. It was not confirmed that the pollen could be a pathway of *Psa*
433 dispersion, even if *Psa* was already found on pollen (47). Furthermore, pollen used for

434 artificial pollination in France is mainly locally produced. Spadaro et al (2010) (50) suggested
435 that *Psa* was probably introduced in Piemonte by infected propagation material. In France,
436 imported kiwifruit plant material originated of Italy and New Zealand. The sharing of
437 haplotypes between strains isolated in France and Italy and the precedence of the Italian
438 epidemics support the hypothesis of the Italian origin of the epidemics in France.

439

440 **The present Multilocus VNTR Analysis scheme is not adapted for *Psaf***

441 We previously described four lineages within a *Psaf* strain collection isolated in Australia,
442 France and New Zealand, based on an MLSA (28). The MLVA scheme we developed and
443 have described here enable us to explore more thoroughly the diversity of *Psaf*, thus revealing
444 16 haplotypes with five polymorphic VNTRs. The MST built with the results of the
445 genotyping revealed that the strains split according to their geographical origin.

446 Although strains isolated in Australia, France, and New Zealand are distinct, *Psaf* did not
447 show any genetic structuring. The phylogeny of *Psaf* revealed by MLSA described four
448 lineages within *Psaf* (28) did not fit with absence of structuring defined by MLVA. No
449 evident population structure was revealed with the DAPC method. These observations could
450 be due to size homoplasy, and to low sampling (three strains isolated in Australia, 29 in
451 France and seven in New Zealand). Even if the MLVA scheme revealed more polymorphism
452 than observed with data from MLSA, strains from different MLSA lineages do not share a
453 common MLVA haplotype. We concluded that development of an MLVA based method for
454 assessing the structuring of *Psaf* would need to increase the number of polymorphic VNTRs
455 and to be conducted on MLSA lineages separately because of the long phylogenetic distances
456 observed between lineages (28).

457

458 **Development of a new tool for epidemiological monitoring of kiwifruit canker.**

459 In conclusion, we have developed a reliable set of tools, which combines MLSA and MLVA
460 schemes that are useful for exploring diversity among *Psa* strains isolated in France. This
461 MLVA scheme is a good candidate for tracing the dispersal routes of *Psa* in other places in
462 the world where kiwifruit canker spreads. It would be interesting to test this MLVA scheme
463 by assessing the genetic structuring of *Psa* biovar 1 and *Psa* biovar 2 as well.

464

465 **Acknowledgements**

466 We thank Perrine Portier and Géraldine Taghouti at the International Centre for Microbial
467 Ressources and Plant-associated Bacteria (CIRM-CFBP), International Collection of
468 Microorganisms from Plants (ICMP) Pr J. L. Vanneste of Plant & Food Research Limited,
469 Ruakura Research Center, New Zealand, Pr M. Scortichini and Dr S. Loreti of CRA and
470 CRA-PAV, Roma, Italy, Pr Gorgio Balestra of DAFNE, Viterbo, Italy, Dr A. Calzolari,
471 Servizio Fitosanitario, Bologna, Italy and Pr Liwu Zhu of the Key Laboratory of Pomology,
472 Anhui Agricultural University, Hefei, China, for providing bacterial strains. We also thank
473 Celine Rousseau, Martial Briand and Gilles Hunault for their help with bio-informatical and
474 statistical analysis. We are also grateful to the SFR Quasav and the ANAN platform, in
475 Angers, France for sequencing facilities. A. Cunty is supported by a fellowship provided by
476 Anses and the Region Pays de la Loire, France.

477

478 **Table 1.** Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* used in this study.

479 ^{PT}pathotype-strain. CFBP: Collection Française de Bactéries associées aux Plantes; CRA-
480 FRU : Centro di Ricerca Agronomica per la Fruti; ICMP: International Collection of
481 Microorganisms from Plants ; LSV : Laboratoire de la santé des végétaux. Haplotypes was
482 indicated with number for *Psa* biovar 3 strains and with letter for *Psaf* strains. PACA:
483 Provence-Alpes-Côte-d'Azur.

484

485 **Table 2.** Description of the 11 VNTR markers and PCR conditions.

486 (a) labeling dye: F, 6-FAM; P, PET; H, HEX; N, NED; TRI: VNTR designed on the strain

487 *Psaf* ICMP 18807; TRII: VNTR designed on the strains *Psa* biovar 3 ICMP 18844. *:

488 flanking region size only for *Psa* biovar 3.

489

490 **Table 3.** Characteristics of the 11 VNTRs for *Psa* biovar 3 and *Psaf* strains.

491 n= number of strains; TRI: VNTR designed on the strain *Psaf* ICMP 18807; TRII: VNTR

492 designed on the strains *Psa* biovar 3 ICMP 18844; NA: not analyze.

493

494 **Fig. 1.** Neighbour-Joining tree constructed with the concatenated partial sequences of four

495 housekeeping genes (*gapA*, *gltA*, *gyrB* and *rpoD* respectively) for 15 *Psa* and 6 *Psaf* strains

496 Percentage of bootstrap scores obtained for 1,000 replicates are indicated at each node. b:

497 biovar; L: lineage, the signs represent the geographical origin of the strain: white circle for

498 Japan, black circle for China, grey circle for France, black square for New Zealand, grey

499 square for Italy, white square for Korea and black triangle for Australia.

500

501 **Fig. 2.** Minimum spanning tree (MST) based on the genotyping of 10 VNTRs for the entire

502 strain collection (*Psa* biovar 1, yellow; *Psa* biovar 2, purple; *Psa* biovar 3, red; and *Psaf*,

503 green). Each circle represents a haplotype, and the circle size is proportional to the number of

504 strains sharing the same haplotype. The line color represents the number of the loci that are

505 different between two haplotypes (black, 1; blue, 2; orange, 4; green, 5; green, 6; grey, 7).

506

507 **Fig. 3.** Allele frequencies in populations of different geographical origins of (A) *Psa* biovar 3

508 and (B) *Psaf*. For each VNTR one color corresponds to one haplotype.

509

510 **Fig. 4.** Minimum spanning tree (MST) based on the genotyping of 11 VNTRs of (A) 340 *Psa*
511 biovar 3 and of 10 VNTRs of (B) 39 *Psaf*. Colors refer to the geographical origin of the
512 strains (green: France, red: Italy, purple: New Zealand, yellow: China, light pink: Chile, pink:
513 Australia). The numbers refer to the haplotype reported in Table 1. Each circle represents a
514 haplotype, and the circle size is proportional to the number of strains sharing the same
515 haplotype. The color of line between circles represents the number of locus which differs
516 between two haplotypes (black: 1 locus, blue: 2 loci, orange: 4 loci, green: 5 loci). The grey
517 areas represent clonal complexes.

518

519 **Fig. 5.** Discriminant Analysis of Principal Components of 340 *Psa* b3 strains. The scatterplot
520 shows a projection of the four genetic clusters retained from BIC values onto axis 1
521 (horizontal axis) and axis 2 (vertical axis). The eigenvalues showed that the genetic structure
522 was captured by the first two principle components. The dots represent the individuals and the
523 cluster as inertia ellipses. Clusters 1 and 4 grouped strains isolated in France and in Italy;
524 cluster 2 grouped strains isolated in China (AHPP1, HWD3, JF8, SH8, WT2), and cluster 3
525 grouped strains isolated in China (GC31, JZGMC1, SCHY9) and all strains isolated in New
526 Zealand and Chile.

527

528 **Table S1.** List of the repeats number obtained for each strain at each VNTR locus used in this
529 study.

530

531

532 **References**

533

534 1. **Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P.**535 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and
536 agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution* **19**:535-544.537 2. **Keim P, Klevytska A, Price L, Schupp J, Zinser G, Smith K, Hugh-Jones M,**538 **Okinaka R, Hill K, Jackson P.** 1999. Molecular diversity in *Bacillus anthracis*. *J.*
539 *Appl Microbiol* **87**:215-217.540 3. **Lindstedt BA.** 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for
541 genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* **26**:2567-2582.542 4. **Elberse KE, Nunes S, Sá-Leão R, van der Heide HG, Schouls LM.** 2011. Multiple-
543 locus variable number tandem repeat analysis for *Streptococcus pneumoniae*:
544 comparison with PFGE and MLST. *PloS One* **6**:e19668.545 5. **Vogler AJ, Keys C, Nemoto Y, Colman RE, Jay Z, Keim P.** 2006. Effect of repeat
546 copy number on variable-number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157:
547 H7. *J Bacteriol* **188**:4253-4263.548 6. **Benson G.** 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences.
549 *Nucleic Acids Res* **27**:573.550 7. **Kolpakov R, Bana G, Kucherov G.** 2003. mreps: efficient and flexible detection of
551 tandem repeats in DNA. *Nucleic Acids Res* **31**:3672-3678.552 8. **Van Belkum A, Scherer S, Van Leeuwen W, Willemse D, Van Alphen L,**
553 **Verbrugh H.** 1997. Variable number of tandem repeats in clinical strains of
554 *Haemophilus influenzae*. *Infection and immunity* **65**:5017-5027.555 9. **Keim P, Price L, Klevytska A, Smith K, Schupp J, Okinaka R, Jackson P, Hugh-**
556 **Jones M.** 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals
557 genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **182**:2928-2936.

- 558 10. **Della Coletta-Filho H, Takita MA, de Souza AA, Aguilar-Vildoso CI, Machado**
559 **MA.** 2001. Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a variable number of
560 tandem repeat analysis. *Appl Environ Microbiol* **67**:4091-4095.
- 561 11. **Ngoc LBT, Verniere C, Jarne P, Brisse S, Guerin F, Boutry S, Gagnevin L,**
562 **Pruvost O.** 2009. From local surveys to global surveillance: three high-throughput
563 genotyping methods for epidemiological monitoring of *Xanthomonas citri* pv. *citri*
564 pathotypes. *Appl Environ Microbiol* **75**:1173-1184.
- 565 12. **N'Guessan CA, Brisse S, Le Roux-Nio A-C, Poussier S, Koné D, Wicker E.** 2013.
566 Development of variable number of tandem repeats typing schemes for *Ralstonia*
567 *solanacearum*, the agent of bacterial wilt, banana Moko disease and potato brown rot.
568 *J Microbiol Methods* **92**:366-374.
- 569 13. **Matos LA, Hilf ME, Chen J, Folimonova SY.** 2013. Validation of 'variable number
570 of tandem repeat'-based approach for examination of '*Candidatus Liberibacter*
571 *asiaticus*' diversity and its applications for the analysis of the pathogen populations in
572 the areas of recent introduction. *PloS One* **8**:e78994.
- 573 14. **Bühlmann A, Dreo T, Rezzonico F, Pothier JF, Smits TH, Ravnikar M, Frey JE,**
574 **Duffy B.** 2013. Phylogeography and population structure of the biologically invasive
575 phytopathogen *Erwinia amylovora* inferred using minisatellites. *Environ Microbiol*
- 576 15. **Cesbron S, Pothier J, Gironde S, Jacques M-A, Manceau C.** 2014. Development of
577 multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) for *Xanthomonas*
578 *arboricola* pathovars. *J Microbiol methods* **100**:84-90.
- 579 16. **Gironde S, Manceau C.** 2012. Housekeeping gene sequencing and multilocus
580 variable-number tandem-repeat analysis to identify subpopulations within
581 *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* that
582 correlate with host specificity. *Appl Environ Microbiol* **78**:3266-3279.

- 583 17. **Scortichini M, Marcelletti S, Ferrante P, Petriccione M, Firrao G.** 2012.
584 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multi-faceted, pandemic
585 pathogen. *Mol Plant Pathol* **13**:631-640.
- 586 18. **Vanneste JL, Yu J, Cornish DA, Tanner DJ, Windner R, Chapman JR, Taylor**
587 **RK, Mackay JF, Dowlut S.** 2013. Identification, virulence, and distribution of two
588 biovars of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in New Zealand. *Plant Dis* **97**:708-
589 719.
- 590 19. **Takikawa Y, Serizawa S, Ichikawa T, Tsuyumu S, Goto M.** 1989. *Pseudomonas*
591 *syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: the causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan.
592 *Ann Phytopathol Soc Japan* **55**:437-444.
- 593 20. **Scortichini M.** 1994. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit
594 in Italy. *Plant Pathol.* **43**:1035-1038.
- 595 21. **Koh Y, Cha BJ, Chung HJ, Lee DH.** 1994. Outbreak and spread of bacterial canker
596 of kiwifruit. *Korean J Plant Pathol* **10**:68-72.
- 597 22. **Wang Z, Tang X, Liu S.** 1992. Identification of the pathogenic bacterium for
598 bacterial canker on *Actinidia* in Sichuan. J. Southwest Agricultural University,
599 unpaginated. [http://en.cnki.com/cn/Article_en/CJFDTOTAL-XNND199206007.](http://en.cnki.com/cn/Article_en/CJFDTOTAL-XNND199206007.htm)
600 [htm.](http://en.cnki.com/cn/Article_en/CJFDTOTAL-XNND199206007.htm)
- 601 23. **Ferrante P, Scortichini M.** 2009. Identification of *Pseudomonas syringae* pv.
602 *actinidiae* as causal agent of bacterial canker of yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis*
603 Planchon) in central Italy. *J Phytopathol* **157**:768-770.
- 604 24. **Balestra GM, Mazzaglia A, Quattrucci A, Renzi M, Rossetti A.** 2009. Current
605 status of bacterial canker spread on kiwifruit in Italy. *Australasian Plant Dis Notes*
606 **4**:34-36.

- 607 25. **EPPO**. 2013. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Germany. EPPO
608 Rep Serv 9: 2013/185.
- 609 26. **Dreo T, Pirc M, Ravnkar M, Zezlina I, Poliakov F, Rivoal C, Nice F, Cuntly A**.
610 2014. First Report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the Causal Agent of
611 Bacterial Canker of Kiwifruit in Slovenia. Plant Dis **98**:1578-1578.
- 612 27. **Holeva MC, Glynos PE, Karafila CD**. 2015. First report of bacterial canker of
613 kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Greece. Plant Dis
614 <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-14-0738-PDN>.
- 615 28. **Cuntly A, Poliakov F, Rivoal C, Cesbron S, Saux FL, Lemaire C, Jacques M,**
616 **Manceau C, Vanneste J**. 2014. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv.
617 *actinidiae* (*Psa*) isolated from France and assignment of *Psa* biovar 4 to a de novo
618 pathovar: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov. Plant Pathol DOI:
619 10.1111/ppa.12297.
- 620 29. **EPPO**. 2011. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Australia, p.
621 2130. EPPO Rep. Serv. 6: 2011/130.
- 622 30. **Butler M. I. SPA, Black M. A., Day R. C., Lamont I. L., Poulter R. T. M**. 2013.
623 *Pseudomonas syringae* pv. from recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker belong
624 to different clones that originated in China. PLoS One **8**:1-18.
- 625 31. **Chapman JR, Taylor RK, Weir BS, Romberg MK, Vanneste JL, Luck J,**
626 **Alexander BJ**. 2012. Phylogenetic relationships among global populations of
627 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Phytopathol **102**:1034-1044.
- 628 32. **Mazzaglia A, Studholme DJ, Taratufolo MC, Cai R, Almeida NF, Goodman T,**
629 **Guttman DS, Vinatzer BA, Balestra GM**. 2012. *Pseudomonas syringae* pv.
630 *actinidiae* (PSA) isolates from recent bacterial canker of kiwifruit outbreaks belong to
631 the same genetic lineage. PLoS One **7**:e36518.

- 632 33. **McCann HC, Rikkerink EH, Bertels F, Fiers M, Lu A, Rees-George J, Andersen**
633 **MT, Gleave AP, Haubold B, Wohlers MW.** 2013. Genomic analysis of the kiwifruit
634 pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* provides insight into the origins of an
635 emergent plant disease. *PLoS Pathog* **9**:e1003503.
- 636 34. **Sarkar SF, Guttman DS.** 2004. Evolution of the core genome of *Pseudomonas*
637 *syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Appl Environ Microbiol* **70**:1999-
638 2012.
- 639 35. **Hwang MS, Morgan RL, Sarkar SF, Wang PW, Guttman DS.** 2005. Phylogenetic
640 characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*.
641 *Appl Environ Microbiol* **71**:5182-5191.
- 642 36. **Hall TA.** 1999, p 95-98. *Nucleic Acids Symposium Series*.
- 643 37. **Rozen S, Skaletsky H.** 2000. Primer3 on the WWW for general users and for
644 biologist programmers. *Meth Mol Biol* **132**:365-386.
- 645 38. **Hunter PR, Gaston MA.** 1988. Numerical index of the discriminatory ability of
646 typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol*
647 **26**:2465-2466.
- 648 39. **Goudet J.** 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J*
649 *Hered* **86**:485-486.
- 650 40. **Jombart T, Devillard S, Balloux F.** 2010. Discriminant analysis of principal
651 components: a new method for the analysis of genetically structured populations.
652 *BMC Genet* **11**:94.
- 653 41. **Achtman M.** 2008. Evolution, population structure, and phylogeography of
654 genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* **62**:53-70.
- 655 42. **Zhou K, Aertsen A, Michiels CW.** 2014. The role of variable DNA tandem repeats
656 in bacterial adaptation. *FEMS Microbiol Reviews* **38**:119-141.

- 657 43. **Vernière C, Bui Thi Ngoc L, Jarne P, Ravigné V, Guérin F, Gagnevin L, Le Mai**
658 **N, Chau NM, Pruvost O.** 2014. Highly polymorphic markers reveal the
659 establishment of an invasive lineage of the citrus bacterial pathogen *Xanthomonas citri*
660 pv. *citri* in its area of origin. *Environ Microbiol* 16:2226-2237.
- 661 44. **Li X, Li J, Soejarto DD.** 2009. Advances in the study of the systematics of *Actinidia*
662 Lindley. *Frontiers of Biol in China* 4:55-61.
- 663 45. **Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG.** 2004. eBURST: inferring
664 patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from
665 multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 186:1518-1530.
- 666 46. **Stefani E, Giovanardi D.** 2012. Dissemination of *Pseudomonas syringae* pv.
667 *actinidiae* through pollen and its epiphytic life on leaves and fruits. *Phytopathologia*
668 *Mediterranea* 50:489-496.
- 669 47. **Vanneste J, Yu J, Cornish D, Max S, Clark G.** 2011. Presence of *Pseudomonas*
670 *syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit, on
671 symptomatic and asymptomatic tissues of kiwifruit. *New Zealand Plant Protection*
672 64:241-245.
- 673 48. **Spinelli F, Donati I, Vanneste JL, Costa M, Costa G.** 2011, p 461-466. VII
674 International Symposium on Kiwifruit, Faenza, Italy.
- 675 49. **Serizawa S, Ichikawa T, Takikawa Y, Tsuyumu S, Goto M.** 1989. Occurrence of
676 bacterial canker of kiwifruit in Japan: description of symptoms, isolation of the
677 pathogen and screening of bactericides. *Ann Phytopathol Soc Japan* 55:427-436.
- 678 50. **Spadaro D, Amatulli MT, Garibaldi A, Gullino ML, Vittone G, Nari L,**
679 **Pellegrino S, Morone C, Mason G, Ortalda E, Grosso S.** 2010. È arrivato in
680 Piemonte il cancro batterico del kiwi. *L'Informatore Agrar* 66(27):58-59.

Table 1 Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* used in this study.

Strain name	Name	Biovar	Host	Year of isolation	Country of isolation	Reference	MLVA type
CFBP 4909 ^{PT} / ICMP 9617	<i>Psa</i>	1	<i>A. delictiosa</i>	1984	Japan	Takikawa <i>et al.</i> (1989)	
ICMP 19071	<i>Psa</i>	2	<i>A. chinensis</i>	1992	Korea	Koh <i>et al.</i> (1994), Chapman <i>et al.</i> (2012)	
HWD3	<i>Psa</i>	3	<i>A. delictiosa</i>	2012	China (Shaanxi)	L. Zhu	1
JF8	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	China (Anhui)	L. Zhu	1
AHPP1	<i>Psa</i>	3	<i>Philagra</i> sp	2012	China (Anhui)	L. Zhu	2
GC31	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	China (Guizhou)	L. Zhu	3
JZGMC1	<i>Psa</i>	3	<i>Alternanthera philoxeroides</i>	2013	China (Anhui)	L. Zhu	4
SCHY9	<i>Psa</i>	3	<i>A. delictiosa</i>	2012	China (Sichuan)	L. Zhu	5
T5	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	6
UOM1	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	7
UOM2	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	7
1.1	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	8
10.6	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	8
17460.1 / LSV 46.19	<i>Psa</i>	3	<i>A. delictiosa</i>	2012	Italy	A. Calzolari	8
17704.1 / LSV 46.20	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	Italy	A. Calzolari	8
2.2	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	8
4.2	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	8
4.4	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	8
4.6	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	8
E7	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy (Contarino)	J. Vanneste	8
H1.2	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	8
H1.3	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	8
H1.4	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	8
2.1	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	9
CFBP 8100	<i>Psa</i>	3	<i>A. delictiosa</i>	2013	France (Midi-Pyrénées)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	10
LSV 36.45	<i>Psa</i>	3	<i>A. delictiosa</i>	2010	France (Rhône-Alpes)	This study	10
LSV 37.37	<i>Psa</i>	3	<i>A. delictiosa</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study	10
LSV 37.64	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	10
LSV 38.08	<i>Psa</i>	3	<i>A. delictiosa</i>	2011	France (PACA)	This study	10
LSV 38.13	<i>Psa</i>	3	<i>A. delictiosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	10

LSV 38.14	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	10
LSV 38.79	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (PACA)	This study	10
LSV 38.80	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (PACA)	This study	10
LSV 39.36	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	10
LSV 40.52	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	10
LSV 40.53	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	10
LSV 41.06	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	10
LSV 41.18	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	10
LSV 41.56	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	10
LSV 42.61	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	10
LSV 42.64	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Midi-Pyrénées)	This study	10
LSV 42.72	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	10
LSV 43.34	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Midi-Pyrénées)	This study	10
LSV 43.56	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	10
LSV 44.53	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study	10
LSV 37.29	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	11
LSV 37.32	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	11
LSV 41.10	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	11
LSV 41.12	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Midi-Pyrénées)	This study	11
LSV 39.12	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study	12
LSV 38.04	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	13
LSV 43.67	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	13
LSV 44.06	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	13
LSV 36.46	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	France (Rhône-Alpes)	This study	14
LSV 36.47	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	France (Rhône-Alpes)	This study	14
LSV 40.61	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study	14
LSV 42.23	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study	14
CFBP 7910	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	15
LSV 37.13	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study	15
LSV 41.32	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	15
LSV 43.54	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	15
LSV 43.66	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	15
LSV 44.07	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	15
LSV 44.56	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study	16
LSV 37.21	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	17

E4	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy (Contarino)	J. Vanneste	18
E-AB	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy (Contarino)	J. Vanneste	18
ICMP 19439	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	Chile	Butler et al. (2013)	19
ICMP 19455	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	Chile	Butler et al. (2013)	19
ICMP 19457	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	Chile	Butler et al. (2013)	19
LSV 42.70	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	20
LSV 43.25	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	20
LSV 43.38	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	20
CFBP 7287 / LSV 40.47	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2008	Italy (Latina)	Balestra et al. (2009), Vanneste et al. (2013)	21
CFBP 8031	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	Cunty et al. (2014)	21
CFBP 8036	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	Cunty et al. (2014)	21
CFBP 8055	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	Cunty et al. (2014)	21
CFBP 8102	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty et al. (2014)	21
LSV 39.24	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	21
LSV 41.28	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	21
LSV 41.51	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	21
LSV 42.22	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study	21
CFBP 8059	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	Cunty et al. (2014)	22
LSV 41.57	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	22
LSV 43.37	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	22
LSV 43.77	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	23
LSV 43.36	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	24
LSV 42.77	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	25
LSV 40.81	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	26
LSV 40.63	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study	27
LSV 41.19	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	27
LSV 44.61	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study	27
CFBP 8097	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty et al. (2014)	28
LSV 41.22	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	28
WT2	<i>Psa</i>	3	<i>Paulownia fortunei</i>	2013	China (Anhui)	L. Zhu	29
SH8	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2013	China (Shanghai)	L. Zhu	30
LSV 43.55	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	31
LSV 37.75	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	32
LSV 39.76	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	33
3.2	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	34

1.2	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	35
3.8	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	36
SP3	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	36
21726.1 / LSV 46.22	<i>Psa</i>	3	<i>A. delictosa</i>	2013	Italy	A. Calzolari	37
21736.1 / LSV 46.23	<i>Psa</i>	3	<i>A. delictosa</i>	2013	Italy	A. Calzolari	37
10638	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2010	New Zealand	J. Vanneste	38
10787	<i>Psa</i>	3	<i>A. delictosa</i>	2010	New Zealand	J. Vanneste	38
11266	<i>Psa</i>	3	<i>A. delictosa</i>	2010	New Zealand	J. Vanneste	38
11268	<i>Psa</i>	3	<i>A. delictosa</i>	2010	New Zealand	J. Vanneste	38
11282	<i>Psa</i>	3	<i>A. delictosa</i>	2010	New Zealand	J. Vanneste	38
11283	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	New Zealand	J. Vanneste	38
11287	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	New Zealand	J. Vanneste	38
11290	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	New Zealand	J. Vanneste	38
11293	<i>Psa</i>	3	<i>A. delictosa</i>	2010	New Zealand	J. Vanneste	38
11298	<i>Psa</i>	3	<i>A. delictosa</i>	2011	New Zealand	J. Vanneste	38
13093	<i>Psa</i>	3	<i>A. arguta</i>	2011	New Zealand	J. Vanneste	38
CFBP 7811 / 10627	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2010	New Zealand	Vanneste <i>et al.</i> , 2013	38
6.6	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	39
T4	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	39
T6	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	39
1.A	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	40
1.B	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	40
1.D	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	40
1.E	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	40
16803.1 / LSV 46.18	<i>Psa</i>	3	<i>A. delictosa</i>	2012	Italy	A. Calzolari	40
2.9	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	40
21375.1 / LSV 46.21	<i>Psa</i>	3	<i>A. delictosa</i>	2013	Italy	A. Calzolari	40
2E	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	40
4.1	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	40
CFBP 7285 / LSV 39.66	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2008	Italy (Treviso)	Balestra <i>et al.</i> (2009), Vanneste <i>et al.</i> (2013)	40
CORE	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	40

CRA-FRU 11.46	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2010	Italy (Latina)	Scortichini	40
CRA-FRU 8.15	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2009	Italy (Latina)	Scortichini	40
D3-b	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy (Agrintesa)	J. Vanneste	40
D4	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy (Agrintesa)	J. Vanneste	40
H2.1	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	40
H2.2	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	40
H2.3	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	40
L1	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	40
L2	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	40
L3	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste	40
Psa 1c	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy (Italy)	J. Vanneste	40
LSV 44.46	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study	41
CFBP 7906	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	42
CFBP 8026	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	42
CFBP 8047	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	42
CFBP 8062	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2012	France (PACA)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	42
CFBP 8092	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	42
LSV 36.67	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	France (Rhône-Alpes)	This study	42
LSV 36.68	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	France (Rhône-Alpes)	This study	42
LSV 37.24	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	This study	42
LSV 43.30	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study	42
D1	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy (Agrintesa)	J. Vanneste	43
CFBP 8060	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	44
LSV 39.28	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	45
LSV 40.67	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	45
LSV 41.34	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	45
LSV 41.36	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	45
LSV 41.37	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	45
LSV 41.50	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	45
LSV 42.69	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	45
LSV 43.53	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	45
CFBP 8065	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	46
LSV 37.76	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	46
LSV 38.19	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	46

LSV 39.03	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	46
LSV 42.45	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Midi-Pyrénées)	This study	47
LSV 42.58	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	48
LSV 42.67	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	48
LSV 42.81	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	48
LSV 43.05	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	48
LSV 43.15	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	48
LSV 37.31	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	49
LSV 41.08	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	49
LSV 41.09	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	49
LSV 39.26	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Centre)	This study	50
LSV 41.35	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	50
LSV 44.22	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	50
CFBP 8056	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	51
CFBP 8063	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	52
CFBP 8089	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	52
LSV 41.13	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	52
LSV 36.69	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	France (Rhône-Alpes)	This study	53
LSV 42.59	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	53
LSV 43.69	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	54
CFBP 7286 / LSV 40.46	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2008	Italy (Latina)	Balestra <i>et al.</i> (2009), Vanneste <i>et al.</i> (2013)	55
CFBP 8025	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2010	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8027	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8028	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8029	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2010	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8030	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2010	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8032	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2011	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8033	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8034	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8035	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8037	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8052	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8053	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8054	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8057	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55

CFBP 8058	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8061	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8064	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Poitou-Charentes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8066	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Midi-Pyrénées)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8087	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8088	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8090	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8091	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Midi-Pyrénées)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8094	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8095	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8096	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Midi-Pyrénées)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8098	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8099	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8101	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8103	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8108	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Poitou-Charentes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8109	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Poitou-Charentes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
CFBP 8110	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Poitou-Charentes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	55
LSV 37.14	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 37.17	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 37.18	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 37.19	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 37.25	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 37.26	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 37.33	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study	55
LSV 37.34	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 37.36	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 37.38	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 37.41	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study	55
LSV 37.42	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study	55
LSV 37.43	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 37.51	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 37.52	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 37.55	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 37.58	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	This study	55

LSV 37.63	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 37.65	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 37.66	<i>Psa</i>	3	<i>A. arguta</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 37.68	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 37.69	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study	55
LSV 37.73	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 37.77	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 37.78	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 37.79	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 37.80	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 38.01	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 38.02	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 38.03	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 38.05	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 38.06	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 38.09	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 38.11	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 38.12	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 38.15	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 38.16	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 38.22	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 39.02	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study	55
LSV 39.06	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 39.11	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 39.13	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study	55
LSV 39.14	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 39.23	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 39.25	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 39.29	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 39.30	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 39.38	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 39.39	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 39.40	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 39.41	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 39.44	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study	55

LSV 39.45	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study	55
LSV 40.10	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 40.11	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 40.13	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study	55
LSV 40.20	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 40.22	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 40.23	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 40.30	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 40.33	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 40.34	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 40.58	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 40.62	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 40.64	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 40.65	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 40.66	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 40.69	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 40.70	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 40.71	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 40.73	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 41.15	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 41.16	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 41.17	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Midi-Pyrénées)	This study	55
LSV 41.20	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 41.23	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 41.24	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 41.25	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 41.26	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 41.29	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 41.38	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 41.39	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 41.41	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 41.42	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 41.49	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Midi-Pyrénées)	This study	55
LSV 41.52	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 41.55	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	55

LSV 41.62	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 41.67	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Midi-Pyrénées)	This study	55
LSV 42.16	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 42.20	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 42.44	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Midi-Pyrénées)	This study	55
LSV 42.63	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Midi-Pyrénées)	This study	55
LSV 42.68	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 42.71	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 42.76	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 42.78	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 42.79	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 42.80	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 43.07	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Pays de la Loire)	This study	55
LSV 43.16	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 43.17	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 43.26	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 43.27	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 43.29	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 43.35	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Midi-Pyrénées)	This study	55
LSV 43.57	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 43.58	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 43.59	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 43.68	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 43.75	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 43.78	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 44.08	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 44.18	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 44.23	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	55
LSV 44.31	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 44.47	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 44.48	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 44.49	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 44.52	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 44.54	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study	55
LSV 44.55	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study	55

LSV 44.62	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study	55
ICMP 18744 / CRA-FRU 11.41	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	Italy (Rome)	Butler et al. (2013)	55
CFBP 7907	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Pays de la Loire)	Cunty et al. (2014)	A
CFBP 8048	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Pays de la Loire)	Cunty et al. (2014)	A
CFBP 8051	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Pays de la Loire)	Cunty et al. (2014)	A
CFBP 8067	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Pays de la Loire)	Cunty et al. (2014)	A
CFBP 8085	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Pays de la Loire)	Cunty et al. (2014)	A
CFBP 7951 / ICMP 18807	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2011	New Zealand	Butler et al. (2013), Cunty et al. (2014)	B
CFBP 8044 / ICMP 19440	<i>Psaf</i>	4	<i>A. chinensis</i>	2010	Australie (Australie)	Chapman et al. (2012), Cunty et al. (2014)	C
CFBP 8045/ ICMP 19486	<i>Psaf</i>	4	<i>A. chinensis</i>	2010	Australie (Australie)	Chapman et al. (2012), Cunty et al. (2014)	C
CFBP 8046 / ICMP 19441	<i>Psaf</i>	4	<i>A. chinensis</i>	2010	Australie (Australie)	Chapman et al. (2012), Cunty et al. (2014)	C
CFBP 8043	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Pays de la Loire)	Cunty et al. (2014)	D
LSV 43.74	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Mayenne)	This study	D
CFBP 8161	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Centre)	Cunty et al. (2014)	E
CFBP 7909	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Poitou-Charentes)	Cunty et al. (2014)	F
CFBP 8039	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	Cunty et al. (2014)	F
CFBP 8086	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Pays de la Loire)	Cunty et al. (2014)	F
CFBP 8106	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Pays de la Loire)	Cunty et al. (2014)	F
LSV 43.40	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study	F
CFBP 8107	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty et al. (2014)	G
LSV 44.20	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Pays de la Loire)	This study	H
CFBP 7812 / ICMP19098	<i>Psaf</i>	4	<i>A. chinensis</i>	2010	New Zealand	Vanneste et al., 2013	I
CFBP 7903 / ICMP18882	<i>Psaf</i>	4	<i>A. chinensis</i>	2010	New Zealand	Chapman et al. (2012), Cunty et al. (2014)	I
CFBP 7904 / ICMP 18883	<i>Psaf</i>	4	<i>A. chinensis</i>	2010	New Zealand	Chapman et al. (2012), Cunty et al. (2014)	I
LSV 43.28	<i>Psaf</i>	4	<i>A. chinensis</i>	2013	France (Limousin)	This study	J
LSV 43.43	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Limousin)	This study	J
LSV 43.44	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Limousin)	This study	J
LSV 43.65	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Mayenne)	This study	K
CFBP 7901 / ICMP 18803	<i>Psaf</i>	4	<i>A. chinensis</i>	2010	New Zealand	Chapman et al. (2012), Cunty et al. (2014)	L

CFBP 7902 / ICMP 18804	<i>Psaf</i>	4	<i>A. chinensis</i>	2010	New Zealand	Chapman <i>et al.</i> (2012), Cunty <i>et al.</i> (2014)	L
CFBP 7950 / ICMP 18806	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2011	New Zealand	Butler <i>et al.</i> (2013), Cunty <i>et al.</i> (2014)	M
CFBP 8160	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Centre)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	N
CFBP 8038	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Poitou-Charentes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	O
CFBP 8041	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Pays de la Loire)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	O
CFBP 8042	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Pays de la Loire)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	O
CFBP 8105	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Pays de la Loire)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	O
CFBP 7908	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	P
CFBP 8040	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Pays de la Loire)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	P
CFBP 8049	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Pays de la Loire)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	P
CFBP 8050	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Pays de la Loire)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	P
CFBP 8104	<i>Psaf</i>	4	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Poitou-Charentes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)	P

^{PT} pathotype-strain. CFBP: Collection Française de Bactéries associées aux Plantes; CRA-FRU : Centro di Ricerca Agronomica per la Fruti; ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants ; LSV : Laboratoire de la santé des végétaux. Haplotypes was indicated with number for *Psaf* biovar 3 strains and with letter for *Psaf* strains. PACA: Provence-Alpes-Côte-d'Azur.

Table 2 Description of the 11 VNTR markers and PCR conditions.

Name	Tandem repeat sequence	Flanking region size (bp)	primers forward	reverse	T _m (°C)	PCR pool
TR10I	CCTGCA	118	F-AGTCTCTGCGCCTCAGGAT	GTCTGAAAAATCCAGTGCC	53	1
TR14I	TTGATG	105	P-CTGAAAACGTCCTGAGCAT	ACTCGTTTGCTGACTCAC	55	1
TR15I	GGCTGGTGCCTCT	138	F-TCGAGAGGAACACCAATGTG	TTTTGCAGACGATGTTTCCA	53	2
TR30I	AGCTACA	98	P-GCGTTACTTTGAGCGGAGTC	CACATATCGGGTAGGTCGG	53	2
TR1II	AGGCCGAA	230	F-TGCCCTGAGTACCTTACC GG	CACCCAGCTCGACAATCAAG	59	3
TR2II	TAGTTGAGG	231*	H-GTCATAACGGGTGAGAGTGC	ACGGCCCTTGAAAGTGACTA	59	3
TR3II	TGGAGGGCT	127	N-CGTGAGGCTCTGACTTTCTG	AAATCCGGGCTGTTTATCGC	59	3
TR39II	TCGAAAA	145	P-CGGTGGACTTGAAGAACACG	CACCCTGAAGTATTGCACC	59	3
TR1III	AATTGTATCTG	136	F-GATTGGTGACGTTGCGATGA	TTGTTGCCCTACACGCTCTA	60	4
TR19II	GCTTGTA	164	H-CCCAGAAAAGAATGCGGACTG	AGCAGGAGATGGAAGAGCTG	60	4
TR64II	TTGAGCT	103	P-GTTGGCGGTATGTGTCTG	CACCACGCTTCTTCTGCAG	60	4

(a) labeling dye: F, 6-FAM; P, PET; H, HEX; N, NED; TRI: VNTR designed on the strain *Psa*f ICMP 18807; TRII: VNTR designed on the strains *Psa* biovar 3 ICMP 18844.

*: flanking region size only for *Psa* biovar 3.

Table 3 Characteristics of the 11 VNTRs for *Psa* biovar 3 and *Psaf* strains.

<i>Psa</i> biovar 3 (n=340)										<i>P. s. pv. actinidifoliorum</i> (n=39)			
VNTR loci	Number of haplotypes	Range of repeats	Simpson's index	Allelic richness						Number of haplotypes	Range of repeats	Simpson's index	Allelic richness
				(n=340)	France (n=264)	Italy (n=53)	New Zealand (n=12)	China (n=8)	Chile (n=3)				
TR10I	11	7 - 21	0.47	7.43	2.28	2.41	1.00	3.37	1.00	10	6 - 16	0.90	10.0
TR14I	3	5 - 8	0.06	2.45	1.24	1.00	1.00	1.00	1.00	5	5 - 9	0.44	5.00
TR15I	3	2 - 4	0.02	1.82	1.04	1.21	1.00	1.00	1.00	1	2	0.00	1.00
TR30I	3	1 - 4	0.06	2.25	1.00	1.21	1.00	1.00	1.00	2	2 - 11	0.05	2.00
TR1II	3	2 - 4	0.13	2.76	1.44	1.00	1.00	1.88	1.00	1	1	0.00	1.00
TR2II	2	2 - 3	0.32	2.00	1.00	1.30	1.00	1.88	1.00	NA	NA	NA	NA
TR3II	3	3 - 5	0.01	1.43	1.00	1.11	1.00	1.62	1.00	1	1	0.00	1.00
TR39II	9	5 - 17	0.17	4.65	1.11	1.21	1.00	3.73	1.00	1	2	0.00	1.00
TR11III	3	2 - 4	0.15	2.77	1.38	1.46	1.00	1.97	1.00	1	1	0.00	1.00
TR19II	7	4 - 10	0.14	4.48	1.31	1.22	1.00	2.87	1.00	2	1 - 2	0.05	2.00
TR64II	5	1 - 7	0.04	2.17	1.02	1.00	1.00	3.20	1.00	1	1	0.00	1.00

n= number of strains; TRI: VNTR designed on the strain *Psaf* ICMP 18807; TRII: VNTR designed on the strains *Psa* biovar 3 ICMP 18744; NA: not analyze.

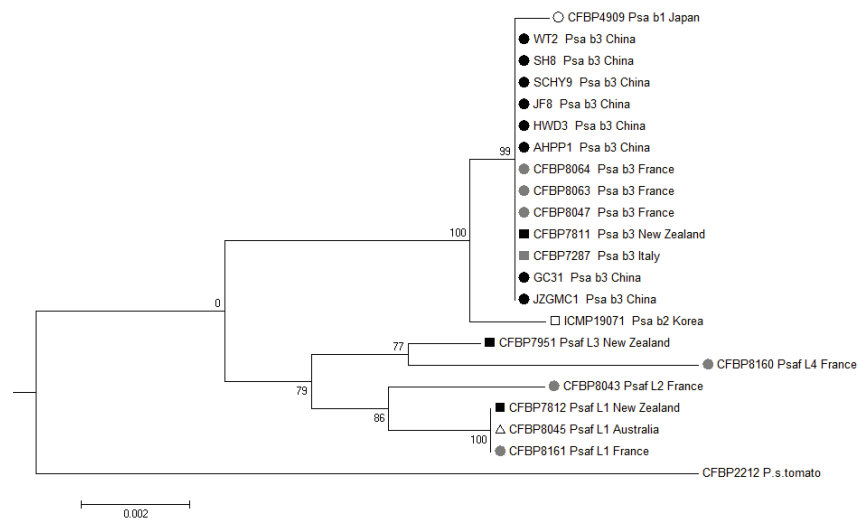


Fig. 1. Neighbour-Joining tree constructed with the concatenated partial sequences of four housekeeping genes (*gapA*, *gltA*, *gyrB* and *rpoD* respectively) for 15 *Psa* and 6 *Psaf* strains. Percentage of bootstrap scores obtained for 1,000 replicates are indicated at each node. b: biovar; L: lineage, the signs represent the geographical origin of the strain: white circle for Japan, black circle for China, grey circle for France, black square for New Zealand, grey square for Italy, white square for Korea and black triangle for Australia.

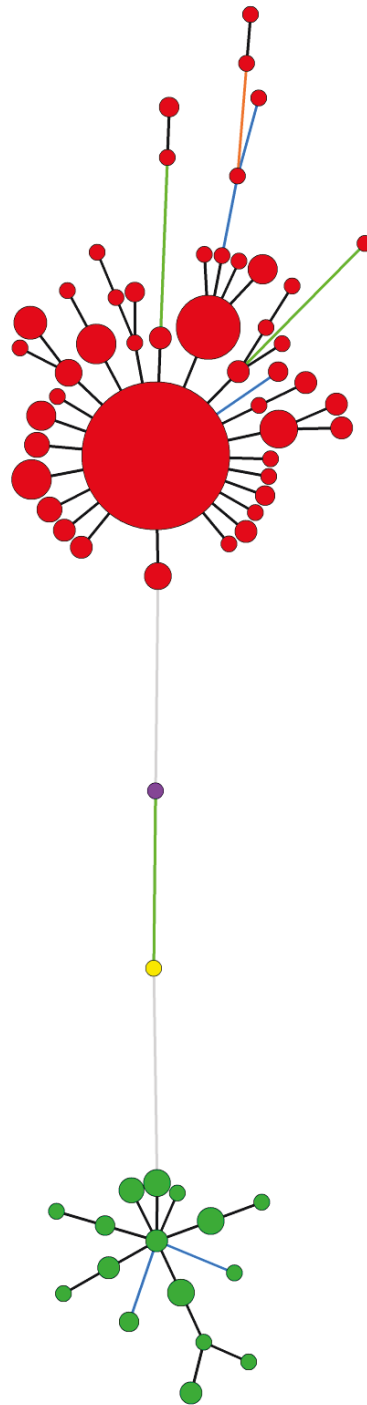


Fig. 2. Minimum spanning tree (MST) based on the genotyping of 10 VNTRs for the entire strain collection (*Psa* biovar 1, yellow; *Psa* biovar 2, purple; *Psa* biovar 3, red; and *Psaf*, green). Each circle represents a MLVA profile, and the circle size is proportional to the number of strains sharing the same MLVA profile. The line color represents the number of the loci that are different between two haplotypes (black, 1; blue, 2; orange, 4; green, 5; grey).

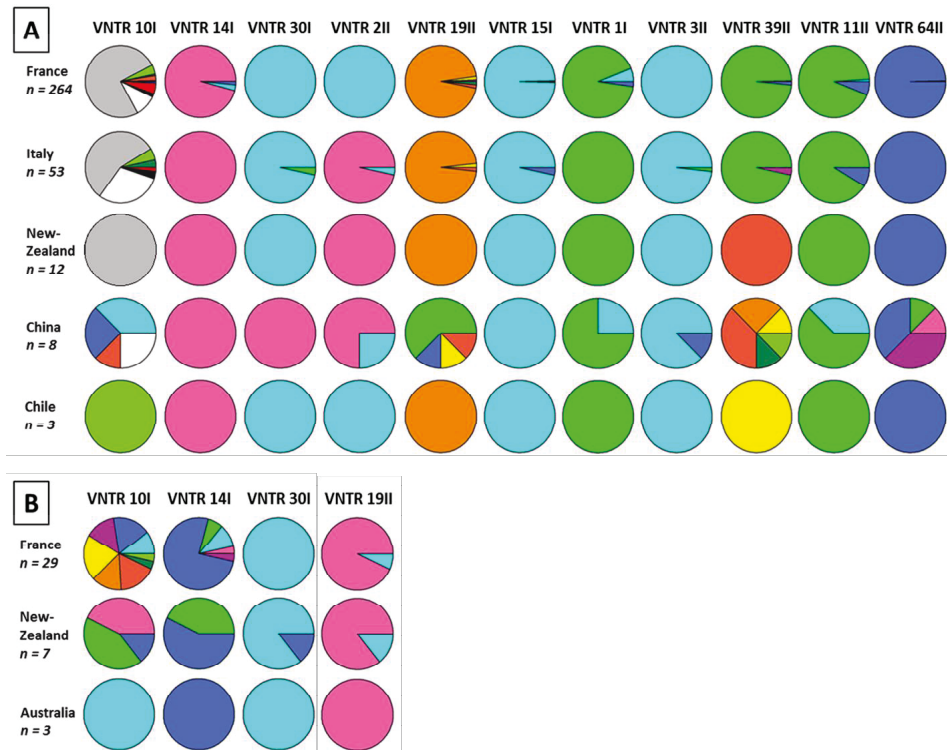


Fig. 3. Allele frequencies in populations of different geographical origins of (A) *Psa* biovar 3 and (B) *Psaf*. For each VNTR one color corresponds to one haplotype.

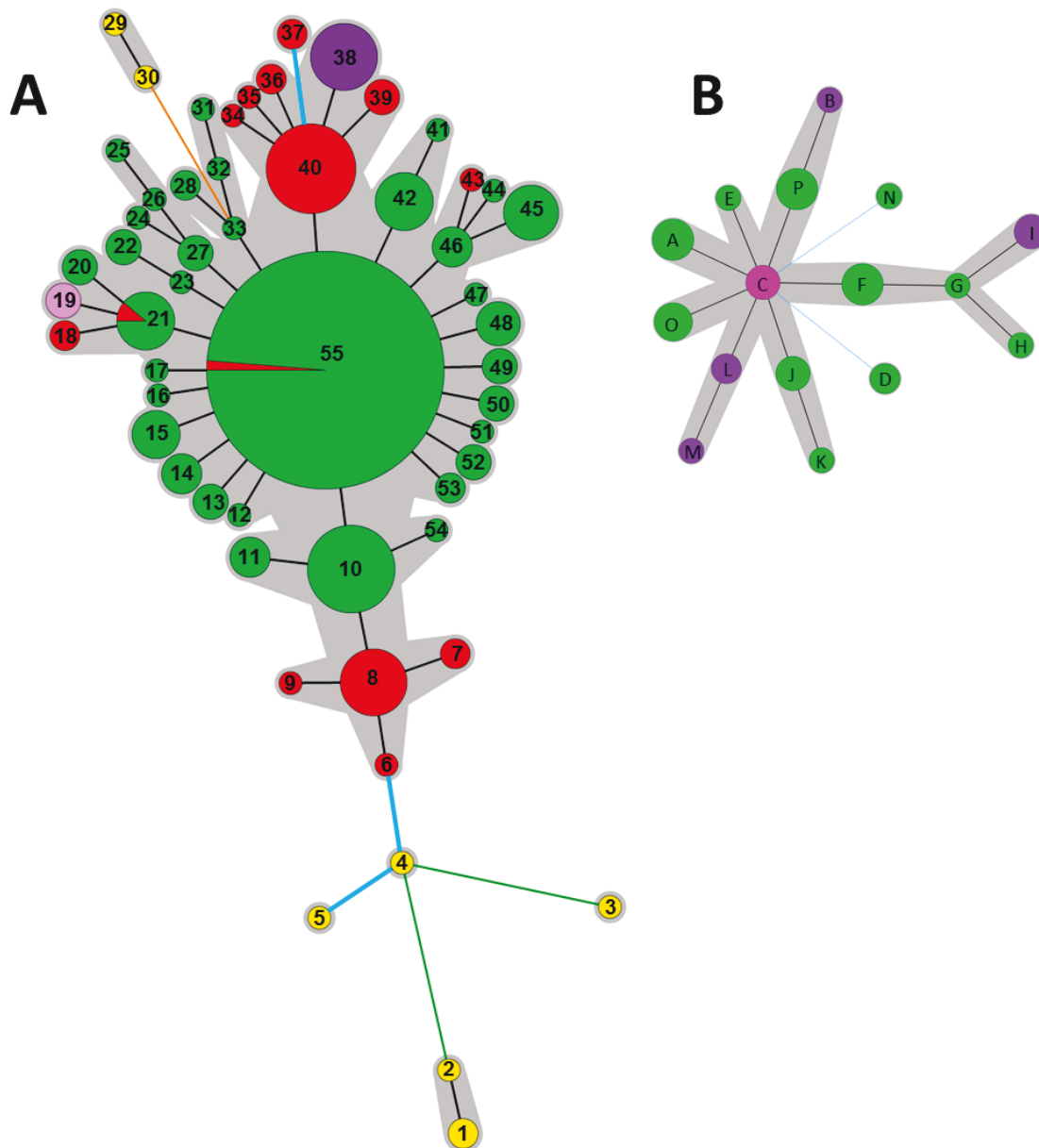


Fig. 4. Minimum spanning tree (MST) based on the genotyping of 11 VNTRs of (A) 340 *Psa* biovar 3 and of 10 VNTRs of (B) 39 *Psaf*. Colors refer to the geographical origin of the strains (green: France, red: Italy, purple: New Zealand, yellow: China, light pink: Chile, pink: Australia). The numbers refer to the haplotype reported in Table 1. Each circle represents a haplotype, and the circle size is proportional to the number of strains sharing the same haplotype. The color of line between circles represents the number of locus which differs between two haplotypes (black: 1 locus, blue: 2 loci, orange: 4 loci, green: 5 loci). The grey areas represent clonal complexes.

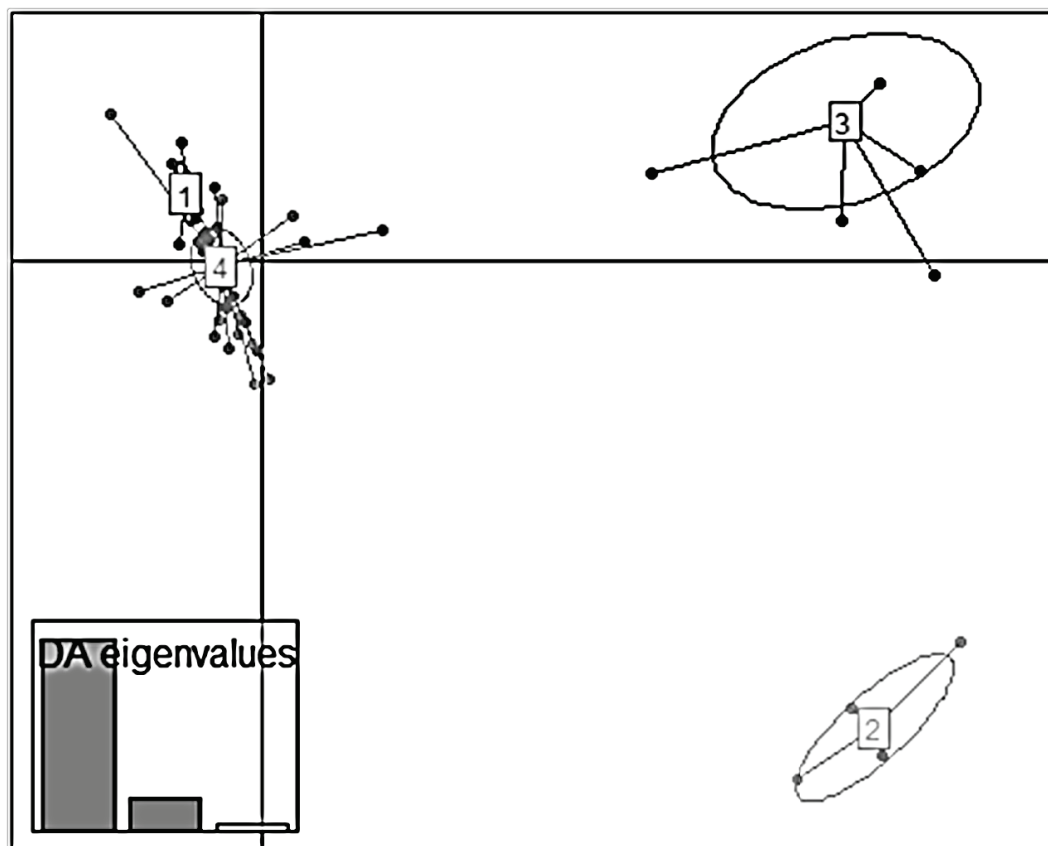


Fig. 5. Discriminant Analysis of Principal Components of 340 *Psa b3* strains. The scatterplot shows a projection of the four genetic clusters retained from BIC values onto axis 1 (horizontal axis) and axis 2 (vertical axis). The eigenvalues showed that the genetic structure was captured by the first two principle components. The dots represent the individuals and the cluster as inertia ellipses. Clusters 1 and 4 grouped strains isolated in France and in Italy; cluster 2 grouped strains isolated in China (AHPP1, HWD3, JF8, SH8, WT2), and cluster 3 grouped strains isolated in China (GC31, JZGMC1, SCHY9) and all strains isolated in New Zealand and Chile.

Table S1. List of the repeats number obtained for each strain at each VNTR locus used in this study.

Strain	TR10I	TR14I	TR15I	TR30I	TR1II	TR2II	TR3II	TR39II	TR11II	TR19II	TR64II	MLVA type	biovar	Countries	Year
CFBP 4909 ^{PT} /															
ICMP 9617	14	4	2	3	1	4	2	14	1	3	3		1	Japan	1984
ICMP 19071	12	6	2	3	1	3	2	10	1	5	3		2	Korea	1994
HWD3	7	5	2	1	3	2	3	12	2	4	7	1	3	Chine	2012
JF8	7	5	2	1	3	2	3	12	2	4	7	1	3	Chine	2012
AHPP1	7	5	2	1	3	2	3	11	2	4	7	2	3	Chine	2012
GC31	14	5	2	1	3	2	5	17	3	5	4	3	3	Chine	2012
JZGMC1	18	5	2	1	3	2	3	14	3	9	5	4	3	Chine	2013
SCHY9	18	5	2	1	3	2	3	15	3	7	5	5	3	Chine	2012
T5	18	5	2	3	3	2	3	6	3	9	5	6	3	Ita	2010
UOM1	18	5	2	3	3	2	3	6	4	8	5	7	3	Ita	2010
UOM2	18	5	2	3	3	2	3	6	4	8	5	7	3	Ita	2010
1.1	18	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	8	3	Ita	2010
10.6	18	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	8	3	Ita	2010
17460,1 /															
LSV 46.19	18	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	8	3	Ita	2012
17704,1 /															
LSV 46.20	18	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	8	3	Ita	2012
2.2	18	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	8	3	Ita	2010
4.2	18	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	8	3	Ita	2010
4.4	18	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	8	3	Ita	2010
4.6	18	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	8	3	Ita	2010
E7	18	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	8	3	Ita	2010
H1.2	18	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	8	3	Ita	2010
H1.3	18	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	8	3	Ita	2010
H1.4	18	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	8	3	Ita	2010
2.1	18	5	2	3	3	2	4	6	3	8	5	9	3	Ita	2010

CFBP 8100	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	10	3	Fr	2013
LSV 36.45	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	10	3	Fr	2010
LSV 37.37	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	10	3	Fr	2011
LSV 37.64	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	10	3	Fr	2011
LSV 38.08	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	10	3	Fr	2011
LSV 38.13	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	10	3	Fr	2011
LSV 38.14	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	10	3	Fr	2011
LSV 38.79	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	10	3	Fr	2011
LSV 38.80	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	10	3	Fr	2011
LSV 39.36	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	10	3	Fr	2011
LSV 40.52	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	10	3	Fr	2011
LSV 40.53	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	10	3	Fr	2011
LSV 41.06	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	10	3	Fr	2012
LSV 41.18	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	10	3	Fr	2012
LSV 41.56	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	10	3	Fr	2012
LSV 42.61	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	10	3	Fr	2013
LSV 42.64	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	10	3	Fr	2013
LSV 42.72	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	10	3	Fr	2013
LSV 43.34	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	10	3	Fr	2013
LSV 43.56	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	10	3	Fr	2013
LSV 44.53	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	10	3	Fr	2013
LSV 37.29	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	4	8	5	11	3	Fr	2011
LSV 37.32	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	4	8	5	11	3	Fr	2011
LSV 41.10	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	4	8	5	11	3	Fr	2012
LSV 41.12	18	5	2	3	3	3	3	3	3	6	4	8	5	11	3	Fr	2012
LSV 39.12	13	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	12	3	Fr	2011
LSV 38.04	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	7	5	13	3	Fr	2011
LSV 43.67	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	7	5	13	3	Fr	2013
LSV 44.06	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	7	5	13	3	Fr	2013
LSV 36.46	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	10	5	14	3	Fr	2010

LSV 36.47	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	3	10	5	14	3	Fr	2010
LSV 40.61	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	3	10	5	14	3	Fr	2012
LSV 42.23	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	3	10	5	14	3	Fr	2012
CFBP 7910	17	5	2	3	3	4	3	3	3	6	3	3	8	5	15	3	Fr	2012
LSV 37.13	17	5	2	3	3	4	3	3	3	6	3	3	8	5	15	3	Fr	2011
LSV 41.32	17	5	2	3	3	4	3	3	3	6	3	3	8	5	15	3	Fr	2012
LSV 43.54	17	5	2	3	3	4	3	3	3	6	3	3	8	5	15	3	Fr	2013
LSV 43.66	17	5	2	3	3	4	3	3	3	6	3	3	8	5	15	3	Fr	2013
LSV 44.07	17	5	2	3	3	4	3	3	3	6	3	3	8	5	15	3	Fr	2013
LSV 44.56	17	5	2	3	3	3	3	3	3	5	3	3	8	5	16	3	Fr	2013
LSV 37.21	17	5	3	3	3	3	3	3	3	6	3	3	8	5	17	3	Fr	2011
E4	16	5	2	3	3	3	2	3	3	6	3	3	8	5	18	3	Ita	2010
E-AB	16	5	2	3	3	3	2	3	3	6	3	3	8	5	18	3	Ita	2010
ICMP 19439	16	5	2	3	3	3	3	3	3	11	3	3	8	5	19	3	Chile	2010
ICMP 19455	16	5	2	3	3	3	3	3	3	11	3	3	8	5	19	3	Chile	2010
ICMP 19457	16	5	2	3	3	3	3	3	3	11	3	3	8	5	19	3	Chile	2010
LSV 42.70	16	8	2	3	3	3	3	3	3	6	3	3	8	5	20	3	Fr	2013
LSV 43.25	16	8	2	3	3	3	3	3	3	6	3	3	8	5	20	3	Fr	2013
LSV 43.38	16	8	2	3	3	3	3	3	3	6	3	3	8	5	20	3	Fr	2013
CFBP 7287 / LSV 40.47	16	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	3	8	5	21	3	Ita	2008
CFBP 8031	16	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	3	8	5	21	3	Fr	2011
CFBP 8036	16	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	3	8	5	21	3	Fr	2011
CFBP 8055	16	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	3	8	5	21	3	Fr	2011
CFBP 8102	16	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	3	8	5	21	3	Fr	2013
LSV 39.24	16	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	3	8	5	21	3	Fr	2011
LSV 41.28	16	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	3	8	5	21	3	Fr	2012
LSV 41.51	16	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	3	8	5	21	3	Fr	2012
LSV 42.22	16	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	3	8	5	21	3	Fr	2012
CFBP 8059	19	5	2	3	3	2	3	3	3	6	3	3	8	5	22	3	Fr	2012

LSV 41.57	19	5	2	3	2	3	3	3	6	3	8	5	22	3	Fr	2012
LSV 43.37	19	5	2	3	2	3	3	3	6	3	8	5	22	3	Fr	2013
LSV 43.77	19	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	23	3	Fr	2013
LSV 43.36	14	8	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	24	3	Fr	2013
LSV 42.77	14	5	2	3	3	3	3	3	6	4	7	5	25	3	Fr	2013
LSV 40.81	14	5	2	3	3	3	3	3	6	4	8	5	26	3	Fr	2012
LSV 40.63	14	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	27	3	Fr	2012
LSV 41.19	14	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	27	3	Fr	2012
LSV 44.61	14	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	27	3	Fr	2013
CFBP 8097	17	6	2	3	2	3	3	3	6	3	8	5	28	3	Fr	2013
LSV 41.22	17	6	2	3	2	3	3	3	6	3	8	5	28	3	Fr	2012
WT2	10	5	2	1	2	2	3	3	14	3	4	1	29	3	Chine	2013
SH8	10	5	2	1	2	2	3	3	14	3	4	5	30	3	Chine	2013
LSV 43.55	21	5	2	3	2	3	3	3	6	3	6	5	31	3	Fr	2013
LSV 37.75	21	5	2	3	2	3	3	3	6	3	8	5	32	3	Fr	2011
LSV 39.76	17	5	2	3	2	3	3	3	6	3	8	5	33	3	Fr	2011
3.2	15	5	2	3	3	3	2	3	6	3	8	5	34	3	Ita	2010
1.2	17	5	2	3	3	3	2	3	6	3	7	5	35	3	Ita	2010
3.8	17	5	2	3	3	3	2	3	8	3	8	5	36	3	Ita	2010
SP3	17	5	2	3	3	3	2	3	8	3	8	5	36	3	Ita	2010
21726,1/ LSV 46.22	17	5	4	4	3	3	2	3	6	3	8	5	37	3	Ita	2013
21736,1/ LSV 46.23	17	5	4	4	3	3	2	3	6	3	8	5	37	3	Ita	2013
10638	17	5	2	3	3	3	2	3	14	3	8	5	38	3	NZ	2010
10787	17	5	2	3	3	3	2	3	14	3	8	5	38	3	NZ	2010
11266	17	5	2	3	3	3	2	3	14	3	8	5	38	3	NZ	2010
11268	17	5	2	3	3	3	2	3	14	3	8	5	38	3	NZ	2010
11282	17	5	2	3	3	3	2	3	14	3	8	5	38	3	NZ	2010
11283	17	5	2	3	3	3	2	3	14	3	8	5	38	3	NZ	2010

11287	17	5	2	3	3	2	3	14	3	8	5	38	3	NZ	2010
11290	17	5	2	3	3	2	3	14	3	8	5	38	3	NZ	2010
11293	17	5	2	3	3	2	3	14	3	8	5	38	3	NZ	2010
11298	17	5	2	3	3	2	3	14	3	8	5	38	3	NZ	2011
13093	17	5	2	3	3	2	3	14	3	8	5	38	3	NZ	2011
CFBP 7811 /															
10627	17	5	2	3	3	2	3	14	3	8	5	38	3	NZ	2010
6.6	17	5	2	3	3	2	3	6	4	8	5	39	3	Ita	2010
T4	17	5	2	3	3	2	3	6	4	8	5	39	3	Ita	2010
T6	17	5	2	3	3	2	3	6	4	8	5	39	3	Ita	2010
1.A	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2010
1.B	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2010
1.D	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2010
1.E	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2010
16803,1 /															
LSV 46.18	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2012
2.9	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2010
21375,1 /															
LSV 46.21	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2013
2E	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2010
4.1	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2010
CFBP 7285 /															
LSV 39.66	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2008
CORE	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2010
CRA-FRU 11.46	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2010
CRA-FRU 8.15	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2009
D3-b	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2010
D4	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2010
H2.1	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2010
H2.2	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2010
H2.3	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2010

L1	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2010
L2	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2010
L3	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2010
Psa Ic	17	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	40	3	Ita	2010
LSV 44.46	17	5	1	3	3	3	3	6	4	8	5	41	3	Fr	2013
CFBP 7906	17	5	2	3	3	3	3	6	4	8	5	42	3	Fr	2011
CFBP 8026	17	5	2	3	3	3	3	6	4	8	5	42	3	Fr	2010
CFBP 8047	17	5	2	3	3	3	3	6	4	8	5	42	3	Fr	2010
CFBP 8062	17	5	2	3	3	3	3	6	4	8	5	42	3	Fr	2012
CFBP 8092	17	5	2	3	3	3	3	6	4	8	5	42	3	Fr	2013
LSV 36.67	17	5	2	3	3	3	3	6	4	8	5	42	3	Fr	2010
LSV 36.68	17	5	2	3	3	3	3	6	4	8	5	42	3	Fr	2010
LSV 37.24	17	5	2	3	3	3	3	6	4	8	5	42	3	Fr	2011
LSV 43.30	17	5	2	3	3	3	3	6	4	8	5	42	3	Fr	2013
DI	20	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	43	3	Ita	2010
CFBP 8060	20	5	2	3	3	3	3	6	3	9	5	44	3	Fr	2012
LSV 39.28	20	5	2	3	3	3	3	6	3	8	5	45	3	Fr	2011
LSV 40.67	20	5	2	3	3	3	3	6	3	8	5	45	3	Fr	2012
LSV 41.34	20	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	45	3	Fr	2012
LSV 41.36	20	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	45	3	Fr	2012
LSV 41.37	20	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	45	3	Fr	2012
LSV 41.50	20	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	45	3	Fr	2012
LSV 42.69	20	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	45	3	Fr	2013
LSV 43.53	20	5	2	3	3	2	3	6	3	8	5	45	3	Fr	2013
CFBP 8065	20	5	2	3	3	3	3	6	3	8	5	46	3	Fr	2012
LSV 37.76	20	5	2	3	3	3	3	6	3	8	5	46	3	Fr	2011
LSV 38.19	20	5	2	3	3	3	3	6	3	8	5	46	3	Fr	2011
LSV 39.03	20	5	2	3	3	3	3	6	3	8	5	46	3	Fr	2011
LSV 42.45	17	5	2	3	3	3	3	6	3	8	3	47	3	Fr	2012
LSV 42.58	17	6	2	3	3	3	3	6	3	8	5	48	3	Fr	2013

LSV 42.67	17	6	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	48	3	Fr	2013
LSV 42.81	17	6	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	48	3	Fr	2013
LSV 43.05	17	6	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	48	3	Fr	2013
LSV 43.15	17	6	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	48	3	Fr	2013
LSV 37.31	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	2	8	5	49	3	Fr	2011
LSV 41.08	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	2	8	5	49	3	Fr	2012
LSV 41.09	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	2	8	5	49	3	Fr	2012
LSV 39.26	17	5	2	3	3	3	3	3	3	7	3	8	5	50	3	Fr	2011
LSV 41.35	17	5	2	3	3	3	3	3	3	7	3	8	5	50	3	Fr	2012
LSV 44.22	17	5	2	3	3	3	3	3	3	7	3	8	5	50	3	Fr	2013
CFBP 8056	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	6	5	51	3	Fr	2012
CFBP 8063	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	9	5	52	3	Fr	2012
CFBP 8089	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	9	5	52	3	Fr	2013
LSV 41.13	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	9	5	52	3	Fr	2012
LSV 36.69	15	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	53	3	Fr	2010
LSV 42.59	15	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	53	3	Fr	2013
LSV 43.69	18	5	2	3	3	3	3	3	3	7	3	8	5	54	3	Fr	2013
ICMP 18744 / CRA-FRU 11.41	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Italy	2010
CFBP 7286 / LSV 40.46	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Ita	2008
CFBP 8025	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2010
CFBP 8027	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2010
CFBP 8028	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2010
CFBP 8029	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2010
CFBP 8030	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2010
CFBP 8032	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
CFBP 8033	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
CFBP 8034	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
CFBP 8035	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011

CFBP 8037	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
CFBP 8052	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
CFBP 8053	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
CFBP 8054	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
CFBP 8057	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
CFBP 8058	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
CFBP 8061	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
CFBP 8064	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
CFBP 8066	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
CFBP 8087	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
CFBP 8088	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
CFBP 8090	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
CFBP 8091	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
CFBP 8094	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
CFBP 8095	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
CFBP 8096	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
CFBP 8098	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
CFBP 8099	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
CFBP 8101	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
CFBP 8103	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
CFBP 8108	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
CFBP 8109	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
CFBP 8110	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 37.14	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.17	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.18	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.19	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.25	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.26	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.33	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011

LSV 37.34	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.36	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.38	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.41	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.42	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.43	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.51	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.52	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.55	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.58	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.63	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.65	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.66	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.68	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.69	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.73	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.77	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.78	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.79	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 37.80	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 38.01	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 38.02	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 38.03	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 38.05	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 38.06	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 38.09	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 38.11	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 38.12	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 38.15	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 38.16	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011

LSV 38.22	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 39.02	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 39.06	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 39.11	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 39.13	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 39.14	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 39.23	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 39.25	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 39.29	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 39.30	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 39.38	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 39.39	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 39.40	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 39.41	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 39.44	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 39.45	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 40.10	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 40.11	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 40.13	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 40.20	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 40.22	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 40.23	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 40.30	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 40.33	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 40.34	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2011
LSV 40.58	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 40.62	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 40.64	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 40.65	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 40.66	17	5	2	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012

LSV 40.69	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 40.70	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 40.71	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 40.73	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 41.15	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 41.16	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 41.17	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 41.20	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 41.23	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 41.24	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 41.25	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 41.26	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 41.29	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 41.38	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 41.39	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 41.41	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 41.42	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 41.49	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 41.52	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 41.55	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 41.62	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 41.67	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 42.16	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 42.20	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 42.44	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2012
LSV 42.63	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 42.68	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 42.71	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 42.76	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 42.78	17	5	2	3	3	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013

LSV 42.79	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 42.80	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 43.07	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 43.16	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 43.17	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 43.26	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 43.27	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 43.29	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 43.35	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 43.57	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 43.58	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 43.59	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 43.68	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 43.75	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 43.78	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 44.08	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 44.18	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 44.23	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 44.31	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 44.47	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 44.48	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 44.49	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 44.52	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 44.54	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 44.55	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
LSV 44.62	17	5	2	3	3	3	3	3	6	3	8	5	55	3	Fr	2013
CFBP 7907	14	8	1	3	1	2	1	1	2	1	1	1	A	4	Fr	2011
CFBP 8048	14	8	1	3	1	2	1	1	2	1	1	1	A	4	Fr	2011
CFBP 8051	14	8	1	3	1	2	1	1	2	1	1	1	A	4	Fr	2011
CFBP 8067	14	8	1	3	1	2	1	1	2	1	1	1	A	4	Fr	2012

CFBP 8085	14	8	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	A	4	Fr	2012
CFBP 7951 / ICMP 18807	10	8	1	11	1	2	1	2	1	1	1	1	B	4	NZ	2010
CFBP 8044 / ICMP 19440	7	8	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	C	4	Aus	2011
CFBP 8045 / ICMP 19486	7	8	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	C	4	Aus	1990
CFBP 8046 / ICMP 19441	7	8	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	C	4	Aus	2011
CFBP 8043	7	6	1	3	1	2	1	2	1	2	1	1	D	4	Fr	2011
LSV 43.74	7	6	1	3	1	2	1	2	1	2	1	1	D	4	Fr	2013
CFBP 8161	7	5	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	E	4	Fr	2013
CFBP 7909	12	8	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	F	4	Fr	2012
CFBP 8039	12	8	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	F	4	Fr	2011
CFBP 8086	12	8	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	F	4	Fr	2012
CFBP 8106	12	8	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	F	4	Fr	2013
LSV 43.40	12	8	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	F	4	Fr	2013
CFBP 8107	12	7	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	G	4	Fr	2013
LSV 44.20	16	7	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	H	4	Fr	2013
CFBP 7812 / ICMP19098	8	7	1	3	1	3	1	2	1	1	1	1	I	4	NZ	2010
CFBP 7903 / ICMP18882	8	7	1	3	1	3	1	2	1	1	1	1	I	4	NZ	2010
CFBP 7904 / ICMP18883	8	7	1	3	1	3	1	2	1	1	1	1	I	4	NZ	2010
LSV 43.28	11	8	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	J	4	Fr	2013
LSV 43.43	11	8	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	J	4	Fr	2013
LSV 43.44	11	8	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	J	4	Fr	2013
LSV 43.65	11	9	1	3	1	3	1	2	1	1	1	1	K	4	Fr	2013
CFBP 7901 / ICMP18803	6	9	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	L	4	NZ	2010

CFBP 7902 / ICMP18804	6	8	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	L	4	NZ	2010
CFBP 7950 / ICMP 18806	6	8	1	3	1	1	2	1	1	2	1	1	M	4	NZ	2010
CFBP 8160	15	6	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	N	4	Fr	2013
CFBP 8038	13	8	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	O	4	Fr	2011
CFBP 8041	13	8	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	O	4	Fr	2011
CFBP 8042	13	8	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	O	4	Fr	2011
CFBP 8105	13	8	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	O	4	Fr	2013
CFBP 7908	10	8	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	P	4	Fr	2011
CFBP 8040	10	8	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	P	4	Fr	2011
CFBP 8049	10	8	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	P	4	Fr	2011
CFBP 8050	10	8	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	P	4	Fr	2011
CFBP 8104	10	8	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	P	4	Fr	2013

3. Développement d'un outil de détection de PCR en temps réel de *Psa* et *Psaf*

3.1. Résumé

3.1.1. Introduction

Afin d'assurer une biosurveillance optimale lors d'une épidémie, il est primordial de disposer d'outils de diagnostic sensibles, reproductibles mais surtout spécifiques de l'agent pathogène responsable de la maladie, basés sur la PCR. Les méthodes de PCRs temps-réel ont un avantage supplémentaire vis-à-vis des PCRs dites « conventionnelles » : elles peuvent permettre de détecter les agents pathogènes avec un seuil de détection bas (de l'ordre de 10 UFC par réaction PCR avec une fiabilité de 100%).

L'objectif des travaux présentés au sein de cette partie s'axe autour du développement et de la validation d'un nouvel outil de détection par PCR temps réel utilisant la chimie TaqMan®. L'objectif était de développer 5 PCR temps réel en simplex, spécifiques du pathovar *actinidiae* (incluant les trois biovars), mais aussi de chacun des *Psa* biovar 1, *Psa* biovar 2, *Psa* biovar 3, ainsi que du pathovar *actinidifoliorum* (incluant les quatre lignées).

3.1.2. Méthodologie

Pour développer les 5 PCRs temps réel spécifiques des cinq organismes ciblés, cinq gènes ont été sélectionnés à partir de la littérature et de l'exploitation des cinq génomes de *Psaf* isolées en France (Genome announcement partie 3.2.1) : *hopZ3*, *hopH3*, une protéine hypothétique (locus_tag: A264_RS22700), *hopZ5*, et une autre protéine hypothétique (locus_tag:CFBP8161_005540), spécifiques du pathovar *actinidiae*, *Psa* biovar 1, *Psa* biovar 2, *Psa* biovar 3 et du pathovar *actinidifoliorum*, respectivement. La spécificité et l'homologie de chaque gène pour chaque cible a été d'abord analysée *in silico* par des analyses de BLAST réalisées sur la base de données publique NCBI et sur les 49 génomes de *Psa* et *Psaf* (44 génomes pris sur NCBI et les 5 séquencés au cours de la thèse, voir partie 3.2.1). Pour chaque gène, 5 couples d'amorces ont été dessinés (à partir de la séquence nucléique d'une souche) et leur spécificité a été testée sur 8 souches incluant les différents biovars de *Psa*, *Psaf* et 6 souches de *Pseudomonas syringae sensu lato* génétiquement proches. Une sonde TaqMan a été dessinée pour chaque couple d'amorces retenu et les conditions PCR ont été optimisées

(concentrations en amorces et en sonde). Les PCR temps réel ont été nommées : TaqManPsa, TaqManPsab1, TaqManPsab2, TaqManPsab3 et TaqManPsaf.

L'efficacité et la sensibilité analytique (seuil limite de détection) de chaque PCR ont été évaluées à partir d'échantillons de bois sans symptôme contaminés artificiellement avec une gamme de dilution de dix en dix (concentration finale de 10^7 UFC/mL à 10^2 UFC/mL) de la bactérie à partir de laquelle les couples d'amorces ont été dessinés.

La spécificité analytique (inclusivité et exclusivité) des PCRs a été évaluée sur des collections de souches cibles (8 pour *Psa* biovar1, 3 pour *Psa* biovar 2, 15 pour *Psa* et *Psaf*) et non-cibles (15 au total : *Pseudomonas syringae sensu lato* génétiquement proches, *Erwinia amylovora* et *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*).

La spécificité des 5 PCRs a ensuite été confirmée sur une plus large collection de 416 souches appartenant aux pathovars *actinidiae* et *actinidifoliorum* isolées en France et dans le monde, des souches *Pseudomonas syringae sensu lato* génétiquement proches et une souche d'*Erwinia amylovora* et de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. Les PCRs ont été effectuées sur la plateforme de génotypage à haut débit IdentityPath de l'Anses, une plaque de 1536 puits permettant de tester 6 mélanges PCR sur 256 échantillons en un seul run de PCR temps réel.

La spécificité des PCRs a ensuite été testée sur des échantillons naturellement contaminés de bois et de feuilles prélevés dans des vergers infectés en France.

3.1.3. Résultats et discussion

L'analyse *in silico* des a révélé que chaque gène était bien présent, et avec une homologie de séquence de 100%, chez toutes les souches d'un même organisme ciblé.

L'efficacité obtenue pour chaque PCR est comprise dans une gamme de 95.59 à 109.18%, ce qui reflète une performance correcte. La sensibilité analytique (seuil de détection), mesurée à partir d'une gamme d'échantillons de bois contaminés artificiellement, est de 1.10^4 UFC/mL ou 20 UFC par réaction PCR pour les PCRs ciblant le pathovar *actinidiae*, *Psa* biovar 1 et *Psa* biovar 3. Pour les PCRs ciblant *Psa* biovar 2 et le pathovar *actinidifoliorum* elle est de 1.10^5 UFC/mL ou 200 UFC par réaction PCR. La sensibilité obtenue est satisfaisante.

La spécificité de chaque PCR a dans un premier temps été évaluée sur une petite collection de souches avec des répétitions (duplicat ou triplicat selon les souches ciblées). Chaque PCR a donné un signal positif pour la collection de souches cibles, correspondant à

un inclusivité de 100%. Chaque PCR a donné un signal négatif pour la collection de souches non cibles, correspondant à une exclusivité de 100%. Dans un deuxième temps, la spécificité a été testée sur une large collection de 416 souches en utilisant une plateforme de génotypage à haut débit. La haute spécificité des PCRs ciblant le pathovar *actinidiae*, *Psa* biovar 1, *Psa* biovar 3 et le pathovar *actinidifoliorum* a été confirmée. Pour la PCR ciblant *Psa* biovar 2, six faux positifs ont été détectés parmi les 413 souches non cibles de ce biovar. Parmi ces souches il y a trois *Psa* biovar 3 isolées en France et trois souches de *Pseudomonas syringae* proches de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolées par Jean-Luc Gaignard dans les années 1980 dans des vergers d'*Actinidia*. Le produit PCR n'ayant pas été séquencé, nous ne savons pas si la portion du gène ciblé par les couples d'amorces est présente chez ces six souches ou bien s'il s'agit d'une hybridation aspécifique.

La spécificité des PCRs a ensuite été confirmée à partir d'échantillons de kiwi naturellement contaminés par *Psa* biovar 3 et *Psaf*. La présence de *Psa* biovar 3 et *Psaf* pour ces échantillons avait été au préalable vérifiée avec des tests biochimiques et la PCR duplex de Gallelli au LSV. Ceci confirme que notre méthode peut être appliquée à des échantillons naturellement contaminés.

Pour la PCR ciblant le pathovar *actinidia*, nous avons utilisé un gène commun aux trois biovars, *hopZ3*. Nous pouvons formuler l'hypothèse suivante, quant à son origine, étant donné que les trois biovars ne dérivent pas les uns des autres nous supposons que ce gène est présent chez leur ancêtre commun. Si un nouveau biovar apparaît, il y a de fortes chances qu'il provienne de l'ancêtre commun, et que de ce fait il possède également le gène *hopZ3*. Dans ce cas-là, nous aurions un signal positif avec cette PCR et négatif avec les PCRs qui ciblent les biovars 1, 2 et 3 (sous-entendu que le nouveau biovar ne possède pas les gènes *hopH3*, protéine hypothétique (locus_tag: A264_RS22700) et *hopZ5*). Récemment au Japon une nouvelle souche de *Psa*, appelée *Psa5* a été isolée et se différencie des trois biovars. Ayant un contact au Japon, nous allons essayer d'obtenir cette souche et pouvoir confirmer ou infirmer notre hypothèse.

3.1.4. Conclusion

Le génome Announcement sera prochainement soumis à *Brazilian Journal of Microbiology*.

Concernant le développement et la validation de l'outil de détection par PCR temps réel, nous avons souhaité présenter les résultats sous la forme d'un article en anglais. Il reste

encore des analyses à faire afin de consolider nos résultats, mais cela ne changera pas la structure de l'article qui sera produit et qui est présenté dans la partie 3.2.2. J'ai mentionné dans l'article les analyses qui manquent, en français. Nous espérons soumettre ensuite l'article dans *European Journal of Plant Pathology*.

3.2. Publications

3.2.1. Genome announcement

Draft genome sequences of five *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* strains isolated from kiwifruit in France

Cunty Amandine^{a, b}, Cesbron Sophie^a, Briand Martial^a, Carrère Sébastien^{cd}, Poliakoff Françoise^b, Jacques Marie-Agnès^a, Manceau Charles^b.

^a INRA, UMR1345 IRHS, Beaucouzé, France, ^b ANSES, Plant Health Laboratory, Angers, France, ^c INRA, Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM), UMR 441, F-31326 Castanet-Tolosan, France, ^d CNRS, Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM), UMR 2594, F-31326 Castanet-Tolosan, France LIPM, Plant Health Laboratory, Toulouse, France.

Keywords: Pseudomonas, Actinidia, kiwifruit pathogen, leaves necrotic spots

Abstract

Pseudomonas syringae pv. *actinidifoliorum* (Psaf) causes necrotic spots on leaves of *Actinidia deliciosa* and *Actinidia chinensis*. Psaf was detected in New Zealand, Australia, and France. Four lineages were identified within Psaf. Here, we report the draft genome sequences of five strains of Psaf representative of the lineages 1, 2 and 4 isolated in France. The whole genome of strains isolated in New Zealand and representative of Psaf lineage 1 and 3 were previously sequenced. Availability of supplementary Psaf genome sequences will be useful to develop

molecular tools for detection and to perform comparative genomic analysis to study the relationship between Psaf and other kiwifruit pathogens such as *P. syringae* pv. *actinidiae*.

Introduction

The *Pseudomonas syringae* species groups plant-pathogenic bacteria with a huge host range. Strains of this species cause diseases on more than 180 plant species (Young *et al.*, 2010). *P. syringae* is divided into 8 genomospecies (Gardan *et al.* 1999; Bull *et al.*, 2011) and 13 phylogroups (Berge *et al.*, 2014). In parallel, *P. syringae* is divided into more than 50 pathovars according to the disease that the strains cause on plants. Two pathovars have been described on kiwifruit: *P. syringae* pv *actinidiae* (Takikawa *et al.*, 1984) which causes bacterial canker on kiwifruit and *P. syringae* pv. *actinidifoliorum* (Vanneste *et al.*, 2013, Cunty *et al.* 2015) which causes bacterial spots on kiwifruit. Both *P. s.* pv *actinidiae* and *P. s.* pv. *actinidifoliorum* group in phylogroup 1 and genomospecies 3. Phylogenetic analysis conducted by MLSA classified *P. s.* pv. *actinidifoliorum* strains isolated in Australia, in New Zealand and in France into four different lineages (Cunty *et al.*, 2015). Genomes of *P. s.* pv. *actinidifoliorum* strains, belonging to lineages 1 and 3 and isolated in New Zealand, were sequenced (Butler *et al.*, 2013, McCann *et al.*, 2013). Here, we briefly describe the genome sequencing of five *P. s.* pv. *actinidifoliorum* strains representing three different lineages : lineage 1 (CFBP8161 and CFBP8180) ; lineage 2 (CFBP8043) and lineage 4 (CFBP8039 and CFBP8160) in order to provide genome sequences for at least one strain of each MLSA lineage described so far.

DNA Libraries were constructed from the extracted DNA using the Nextera XT DNA Sample Preparation Kit with average insert sizes of 1200 pb. The sequencing was performed on an Illumina Hi-Seq 2500 platform (Genoscreen, Lille, France) using a TruSeq Rapid SBS kit and a Truseq Rapid paired-end cluster kit v3. The insert sizes for each genome are reported in

Table 1. Reads were assembled in contigs using SOAPdenovo 1.05 (Li *et al.*, 2010) and Velvet (Zerbino and Birney, 2008). Annotation was performed using EuGene-P (v0.3) (Sallet *et al.*, 2013). The features for each genome are reported in Table 1. Analysis of the five genomes showed that an intact phage was present in the lineage 1 strains only. In all the five genomes, in silico analysis confirmed the presence of only one Type III secretion system (hrp 1 type). All specific effector genes (hopO1, hopT1, hopS1, hopAB3, hopF1, hopE1, hopAF1-2) of *P. s. pv. actinidifoliorum* reported by McCann *et al.*, (McCann *et al.*, 2013) were present in all 5 genome sequences. No ICE (Integrative and Conjugative Element) was identified in the genome sequences of *P. s. pv. actinidifoliorum* unlike in *P. s. pv. actinidiae* (Mazzaglia *et al.*, 2013, Butler *et al.*, 2013, McCann *et al.*, 2013). Nucleotide sequence accession numbers: the genome sequences have been deposited at GenBank under the accession numbers listed in Table 1.

Acknowledgements

Support for this work came from in-house funding of EmerSys team at IRHS. We thank Jerome Gouzy (LIPM-INRA SPE platform, Toulouse) for performing automatic annotation of the genomes. We thank Corinne Audusseau and Sandrine Paillard for the isolation of *P. s. pv. actinidiae* and *P. s. pv. actinidifoliorum* strains, Perrine Portier and Géraldine Taghouti at the International Centre for Microbial Resources and Plant-associated Bacteria (CIRM-CFBP), for providing strains and extracted DNAs, respectively. A. Cuntly is supported by a fellowship provided by Anses and the Region Pays de la Loire, France.

- Bartoli, C, Lamichhane, J R, Berge, O, *et al.* (2014). A framework to gage the epidemic potential of plant pathogens in environmental reservoirs: the example of kiwifruit canker. *Mol Plant Pathol* 16: 137–149.
- Berge, O, Monteil, C L, Bartoli, C, *et al.* (2014). A user’s guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLoS ONE*, 9(9) : e105547.
- Bull, C T, Clarke, C R, Cai, R, *et al.* (2011) Multilocus sequence typing of *Pseudomonas syringae sensu lato* confirms previously described genomospecies and permits rapid identification of *P. syringae* pv. *coriandricola* and *P. syringae* pv. *apii* causing bacterial leaf spot on parsley. *Phytopathology* 101(7): 847–858.
- Butler M. I. SPA, Black M. A., Day R. C., *et al.* (2013) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* from Recent Outbreaks of Kiwifruit Bacterial Canker Belong to Different Clones That Originated in China. *PLoS ONE* 8: 1-18.
- Cunty, A, Poliakoff, F, Rivoal, C, *et al.* (2015). Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) isolated from France and assignment of Psa biovar 4 to a de novo pathovar: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov. *Plant Pathol* 64(3): 582-596.
- Gardan L, Shafik H, Belouin S, Broch R, Grimont F, Grimont P, 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas trematae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *Int J of Systematic Bacteriology* 49: 469-78.
- Li, Y., Hu, Y., Bolund, L., & Wang, J. (2010). State of the art de novo assembly of human genomes from massively parallel sequencing data. *Human Genomics* 4(4), 271–277.

- Mazzaglia A, Studholme DJ, Taratufolo MC, *et al.*, 2012. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) isolates from recent bacterial canker of kiwifruit outbreaks belong to the same genetic lineage. PLoS ONE 7: e36518.
- McCann, H C, Rikkerink, E HA, Bertels, F, *et al.* (2013). Genomic analysis of the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* provides insight into the origins of an emergent plant disease. PLoS Pathog 9(7) : e1003503.
- Sallet, E, Roux, B, Sauviac, L, *et al.* (2013). Next-generation annotation of prokaryotic genomes with EuGene-P: Application to *Sinorhizobium meliloti* 2011. DNA Research 20(4), 339–353.
- Takikawa Y, Serizawa S, Ichikawa T, *et al.*, (1989). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: the causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. Annals of the Phytopathological Society of Japan 55: 437-44.
- Vanneste JL, Yu J, Cornish DA, *et al.* (2013). Identification, virulence, and distribution of two biovars of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in New Zealand. Plant Dis 97:708-719.
- Young, J M (2010) Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. J Plant Pathol 92:S1.5-S1.14.
- Zerbino, D R, & Birney, E (2008) Velvet : Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs, 821–829.

Table 1 Genome characteristics

strain code	lineage	accession no.	genome size (Mb)	no. of contigs	N50 (bp)	no. of protein coding genes	G+C content (%)
CFBP8161	1	PRJNA287874	6.24	206	111,837	5,775	58.72
CFBP8180	1	PRJNA287880	6.26	256	98,002	5,833	58.69
CFBP8043	2	PRJNA287873	6.05	176	132,698	5,630	58.80
CFBP8039	4	PRJNA287872	6.1	204	116,909	5,700	58.75
CFBP8160	4	PRJNA287746	6.09	220	113,613	5,679	58.76

3.2.2. Développement d'un outil de détection par PCR temps réel de *Psa* et *Psaf*

Development and validation of a real-time PCR method to detect *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (biovar 1, 2 and 3) and *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pathogenic on kiwifruit

A. Cuntty^{1,2}, S. Cesbron¹, C. François², M-A. Jacques¹, F. Poliakoff², C. Manceau^{2*}.

¹ UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, SFR 4207 Quasav, Institut National de la Recherche Agronomique, Beaucouzé, France. ²Laboratoire de la santé des végétaux, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, Angers, France.

*corresponding author: charles.manceau@anses.fr

Keywords

Kiwifruit bacterial canker, *Actinidia*, biovar, Taqman®, specificity

Running title

Real-time PCR to detect *P. s.* pv. *actinidiae* and pv. *actinidifoliorum*

Abstract

Since 2008, an emerging and pandemic kiwifruit pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*) biovar 3, was detected for the first time in Italy and rapidly spread across kiwifruit producing countries worldwide causing severe yield losses. *P. syringae* pv. *actinidifoliorum* (*Psaf*) is also pathogenic to kiwifruit, and causes similar symptoms on leaves than *Psa* biovar 1, 2 and 3, but does not induce canker. To prevent new introductions and to

follow the spread of the disease, it is relevant to have specific, sensitive and efficient detection tools. In this study, we propose a TaqMan real-time PCR method to identify *Psaf* and differentially detect each *Psa* biovar. Comparisons of genomes allowed finding private genes for each target bacterium. Primer pairs and probes were designed for each private gene and TaqMan reactions were optimized. The threshold level on artificially contaminated wood samples of *Actinidia deliciosa* ranged from 10,000 to 100,000 CFU per mL, corresponding to 20 to 200 CFU per PCR reaction. The assays on target bacterial DNA were highly specific. TaqMan assays only reacted with strains of the target taxons and not with non-target bacteria, including closely related *Pseudomonas syringae*. Among the 416 strains tested, only six false positive reactions were found with the specific TaqMan assays with *Psa* biovar 2. Assays on artificially and naturally contaminated *A. deliciosa* and *A. chinensis* canes and leaves confirmed the performance of TaqMan assays that could be used as routine test.

Introduction

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* (*Psa*) (Takikawa et al., 1989) and *P. syringae* pv. *actinidifoliorum* (*Psaf*) (Cunty et al., 2015) are two bacteria pathogenic on kiwifruit. *Psa* is the causal agent of bacterial canker of kiwifruit and groups together three distinct biovars: biovar 1, biovar 2 and biovar 3 (Vanneste et al., 2013). *Psa* biovar 1 was isolated in Japan in 1984 (Takikawa et al., 1989) and in Italy in 1992 (Scortichini, 1994), *Psa* biovar 2 was isolated in South Korea in 1994 (Koh, 1994). These two biovars were not further detected elsewhere. An epidemic caused by *Psa* biovar 3 has recently and rapidly spread in the main kiwifruit producing countries in Europe, Oceania, South America and Asia (Vanneste, 2013, Wang et al., 1992, Koh et al., 2012) and was qualified as pandemic (Scortichini et al., 2012). The economic losses due to *Psa* biovar 3 were estimated at €2 million in Italy in 2009 and at \$126 million in New Zealand in 2012 (Balestra et al., 2009, Greer, 2012). *Psa* biovar 3 has

been registered on the A2 list of pests recommended for regulation as quarantine pests by the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) (<http://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm>). In November 2012, the Commission of the European Union (EU) ordered surveys and measures to limit the propagation of *Psa* within the EU member states and in other countries outside of the EU. Conversely, *Psaf* is less pathogenic than *Psa*, as this pathovar only causes symptoms on leaves. *Psaf* was isolated in New-Zealand, in Australia and in France and includes four lineages (Vanneste et al., 2013, EPPO, 2011, Cuntly et al., 2015). Only limited economic losses were reported in kiwifruit orchards contaminated with *Psaf* (Cuntly et al., 2015).

In order to control *Psa* strains introduction, to limit the propagation, or to avoid confusing *Psa* and *Psaf* detection, it is necessary to have successful and specific detection tools. PCR-based assays are preferred to differentiate strains as they can be used without any preliminary culture of strain. Several PCR methods are available to diagnose bacterial canker of kiwifruit caused by *Psa*. Two PCR assays were first developed by Koh and Nou (Koh & Nou, 2002) and by Rees-Georges *et al.* (Rees-George et al., 2010), targeting the pathovar *actinidiae*. But these PCR assays were not fully specific as they also detected *Pseudomonas syringae* pv. *theae* (Rees-George et al., 2010). This problem of specificity was then overcome by two new PCR assays, a duplex-PCR and a nested PCR/RFLP assays (Gallelli et al., 2011, Biondi et al., 2013). The duplex PCR assay also allowed distinguishing *Psa* from *Psaf* (Vanneste et al., 2013).

Since 2011, whole genome sequence analyses of strains of *Psa* biovars and of *Psaf* isolated during different outbreaks have been carried out (Marcelletti et al., 2011, Mazzaglia et al., 2012, Butler *et al.*, 2013, McCann et al., 2013, Cuntly *et al.*, 2016), and lead to the development of two more specific detection tools. The first one is a multiplex PCR assay targeting the variable regions within the PPHGI-1-like genomic island of *Psa* biovar 3, thus

allowing to distinguish the strains according to their geographical origins and to assign the strains to three haplotypes: a Japanese/Korean group (*Psa* biovar 1 and 2), an European group (*Psa* biovar 3), and a Chinese/New Zealand group (*Psa* biovar 3) (Balestra et al., 2013). The other one is a specific quantitative real-time PCR assay of *Psa* biovar 3 strains, which targets the *hrpW* effector gene (Gallelli et al., 2013). Although highly specific, none of these methods allowed identifying in one shot the *Psa* biovars as well as both *Psa* and *Psaf* pathovars.

The aim of this study was to develop a new specific and sensitive TaqMan assay to target individually each of the three *Psa* biovars, and each of the *Psa* and *Psaf* pathovars (including the four lineages of *Psaf*). The TaqMan assays were evaluated as part of a validation procedure.

Materials and methods

Bacterial strains

The 416 strains used in this study are listed in Table 1. They included eight strains of *Psa* biovar 1, three strains of *Psa* biovar 2, 342 strains of *Psa* biovar 3, 39 strains of *Psaf*, each isolated from different countries and 22 type-strains of the different *Pseudomonas* genomospecies (Gardan et al., 1999). Two type-strains from other genera than *Pseudomonas* (*Erwinia* and *Xanthomonas*) were also included. Bacteria were maintained as described in (Cunty et al., 2015).

Primer and probe design

The aim of the assay was to develop simplex TaqMan assays targeting specific genes of each *Psa* biovars or *Psa* and *Psaf*. *HopZ3* was previously identified as specific of *Psa*, *HopH3* of *Psa* biovar 1 and *HopZ5* of *Psa* biovar 3 by McCann *et al.* (McCann, *et al.*, 2013). Identification of several specific gene candidates for *Psa* biovar 2 and for *Psaf* was performed

with OrthoMCL analysis (Li et al., 2003) on the genome sequences from 49 *Psa* and *Psaf* strains (44 *Psa* and *Psaf* genomes available in NCBI and five *Psaf* genomes of strains isolated in France (Cunty *et al.*, soon submitted). Identification of orthologous groups was achieved by orthoMCL V2.0.9 analyses on predicted full-length protein (Li *et al.*, 2003). OrthoMCL clustering analyses were performed using the following parameters: P-value Cut-off = 1×10^{-5} ; Percent Match Cut-off = 80; MCL Inflation = 1.5; Maximum Weight = 316. We modified OrthoMCL analysis by using -F'm S' option during the BLASTP pre-process. Unique CDSs, corresponded to CDSs present in one copy in one genome, and groups of orthologs corresponded to CDSs present in one copy in at least two genomes.

The specificity of each selected genes was assessed *in silico* by nucleic BLAST on the available public database NCBI. Finally, one gene was retained for *Psa* biovar 2 and for *Psaf*, both encoding hypothetical proteins. The sequence homology of the five retained genes (*hopZ3*, *hopH3*, *hopZ5* and both genes encoding the hypothetical proteins) among *Psa* and *Psaf* genome sequences was checked *in silico* by alignment using clustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Five primer pairs were designed for each target gene using Primer3 software (Rozen & Skaletsky, 1999), with the following parameters: an amplicon size of 100-150 bp and a T_m equal to 60°C. Dimer formation was evaluated with AmplifiX 1.4 software and the specificity of each primer pair was tested in duplicates on eight *Psa* and *Psaf* strains (CFBP 4909, NCPPB 3871, ICMP 19071, ICMP 19072, CFBP 7286, CFBP 7906, CFBP 8039, CFBP 7951) and six genetically related *Pseudomonas* (CFBP 2353, CFBP 2351, CFBP 4060, CFBP 4702, CFBP 2107, CFBP 2212). After retaining one primer pair, a Taqman® probe was designed for each target sequence using Primer3 software, with the following parameters: T_m at 70°C and any G on 5' end; the dimer formation between the primers and the probe was evaluated with AmplifiX 1.4 software. The probes were labeled with a 5'-end reporter dye (FAM) and a 3'-end quencher dye (BHQ-1). The five TaqMan

assays were named, TaqManPsab1, TaqManPsab2, TaqManPsab3, TaqManPsa and TaqManPsaf.

TaqMan assays conditions

TaqMan PCR assays were performed using the CFX96 (Bio-Rad) with a 20- μ L reaction mixture containing 1X concentration of RealTime Ready DNA Probes Master (Roche), 2 μ L of DNA template and variable combination of concentration of each primer (100 nM, 200 nM and 300 nM) and probe (100 nM, 200 nM and 300 nM) or using a high-throughput real-time instrument, the LightCycler1536® (Roche), with a 2- μ L reaction mixture containing 1 μ L of PCR mixture and 1 μ L of DNA template, with same PCR cycling as presented above.

Analytical sensitivity and repeatability

According to the standard PM7/76 (2) protocol (Anonymous, 2010), analytical sensitivity correspond to the lowest amount of target that can be detected reliably. It was determined using wood extract artificially contaminated with *Psa* biovars (NCPPB 3871, CFBP 7286, ICMP 19071) or *Psaf* (CFBP 8039) bacterial suspensions adjusted spectrophotometrically at OD₆₀₀, and determined using dilution plating in triplicate on KBC-ba agar plates, to obtain 10⁸ CFU/mL and serially diluted in sterile distilled water (SDW) . The strains mentioned in bold in the Table 1 were provided by another laboratory, with unknown DNA concentration. They were probably more concentrated than our DNA, which were extracted by thermal lysis at a concentration of 10⁸ CFU/mL.

Asymptomatic samples of canes were collected in uninfected French orchards of *A. deliciosa* in June 2015. The leaves were removed; the canes were sterilized with ethanol (70%) and cut into pieces of 1-cm in length. For one strain, 10 samples (each composed of 6 g of cane pieces), were individually supplemented with 30 mL of Taylor's buffer (Taylor et al., 2001),

crushed with a hammer in a bag (BioReba AG, Switzerland) and incubated at room temperature at 120 rpm for 40 minutes. The samples were then treated as described by Biondi *et al.* (Biondi *et al.*, 2013). Pellets were suspended in 900 µL of SDW. For each strain, nine asymptomatic samples were contaminated to obtain final concentration ranging from 10^7 to 10^2 CFU/mL and negative controls were inoculated with SDW. Total DNA was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions.

Each dilution series was run in duplicates and standard curves were constructed to evaluate different PCR performance criteria (R^2 , efficiency).

En ce qui concerne l'évaluation de la répétabilité, il nous manque des répétitions pour pouvoir statistiquement asseoir la répétabilité de la méthode. Il faudra passer tous les échantillons sur 4 autres runs.

Analytical specificity

Analytical specificity was assayed according to two criteria, as described in the European Standard EN ISO 16140:2003 (Anonymous, 2003): the inclusivity, i.e., the ability of the different primers to detect all strains of the target organism, and the exclusivity, i.e., the capacity to generate negative responses from non-target strains. The specificity of each TaqMan assays was evaluated i) on target strains for each *Psa* biovar and for *Psaf*: 15 strains for TaqManPsa; 8 for TaqManPsab1; 3 for TaqManPsab2; 15 for TaqManPsab3 and 15 for TaqManPsaf (Table 1); ii) on 15 non-target type or pathotype strains (genetically closely related *Pseudomonas* and two other genera of plant pathogenic bacteria) (Table 1). All TaqMan assays were performed on the CFX96 (Bio-Rad) on duplicates, or on triplicates for target strains (TaqManPsab1 and TaqManPsab2, according to the low number of *Psa* biovar 1 and 2 strains available in our study), to obtain an overall of 30 data points.

The specificity of each TaqMan assays was then tested on the whole collection of 416 strains (Table 1) and PCR were carried out on a high-throughput real-time instrument, the LightCycler1536® (Roche) from the IdentityPath Anses's platform.

Detection from naturally infected wood and leaf samples

Twenty-five naturally infected samples of woods and leaves were collected in French orchards of *A. deliciosa* and *A. chinensis* from May to June 2015. *Psa*-like colonies were isolated as described in (Cunty et al., 2015). The DNA of naturally and artificially contaminated plant samples were extracted from 1 mL of the crude plant extract using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions

Results

Probe and primer design

The OrthoMCL analyses allowed distinguishing groups of orthologs corresponding to unique and specific CDSs of all the 3 *Psa* biovar 2 (63 groups) or all the 28 *Psaf* strains (76 groups) genomes. Nucleic sequences of each CDS were blasted using clustalW2 on the 49 *Psa* and *Psaf* genomes. CDSs present in each target organism with 100 % of homology between the strains and absent in other organism were retained. Two genes, each coding for a hypothetical protein, were selected for *Psa* biovar 2 (locus_tag: A264_RS22700) and *Psaf* (locus_tag:CFBP8161_25030). The analysis of the protein sequences of each gene with InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) did not show the presence of any known protein domain.

The five final genes selected for simplex TaqMan assays were: effector gene *HopZ3*, effector gene *HopH3*, A264_RS22700, effector gene *HopZ5* and CFBP8161_25030, as targets to detect the pathovar *Psa* as a whole, each biovar of *Psa* (biovar 1, *Psa* biovar 2, *Psa* biovar 3)

and the pathovar *Psaf* as a whole, respectively. The *in silico* BLAST performed with clustalW2 on the 49 *Psa* and *Psaf* genomes confirmed the presence of strict homologs (100% identity) in the target organism only, *i.e.* between strains belonging to the same biovar or pathovar.

Primers were already designed in the effector gene *HopZ3* by (Balestra et al., 2013) for the development of a multiplex PCR targeting *Psa*, but the amplicon size was too long to be used in TaqMan scheme. New primers were designed (Table 2).

For each primer pair and probe developed (Table 2), dimer formation was checked *in silico* with the AmplifiX 1.4 software and no dimer formation was predicted. Three primer concentrations (100 nM, 200 nM, 300 nM) combined with three probe concentrations (100 nM, 200 nM, 300 nM) were tested to optimize the TaqMan assay conditions. For all TaqMan assays performed on the CFX96 (Bio-Rad), the final concentration retained was 100 nM for each primer pair and 200 nM for each probe whereas 200 nM for each primer pair and 300 nM for each probe were used on the LightCycler 1536. .

Analytical sensitivity and repeatability

A cycle cut-off of 37.0 was established as the highest value for a positive detection for all the five TaqMan assays on the CFX96 (Bio-Rad). The efficiency of TaqMan assays ranged from 95.59 to 109.18% and R^2 from 0.851 to 0.987.

The detection threshold was 1.10^4 CFU/mL, corresponding to 20 CFU per PCR reaction for TaqManPsa (Ct values of 34.66 and 36.11), TaqManPsab1 (Ct values of 35.02 and 34.32) and TaqManPsab3 (Ct values of 35.57 and 35.71). The detection threshold was 1.10^5 CFU/mL, corresponding to 200 CFU per PCR reaction for TaqManPsab2 (Ct values of 35.62 and 35.37) and TaqManPsaf (Ct values of 36.03 and 35.45).

Afin de confirmer les limites de détection il faut que nous ajoutions au moins une répétition, deux réplicats étant statistiquement limités.

Une fois que des répétitions de runs PCR auront été réalisés, il sera possible de mettre les résultats dans ce paragraphe.

Analytical specificity

The analytical specificity of each TaqMan assay was assayed on a strain collection and repetitions were done to generate at least nine results and at the most 30 results. All these PCRs were performed on the CFX96 (Bio-Rad) in a final reaction volume of 20 μ L.

All repeats of *Psa* strains (n=15), *Psa* biovar 1 strains (n=8), *Psa* biovar 2 strains (n=3), *Psa* biovar 3 strains (n=15), *Psaf* strains (n=15), were detected positive by TaqManPsa, by TaqManPsab1, by TaqManPsab2, by TaqManPsab3 and by TaqManPsaf, respectively. Ct values ranged from 16.12 to 28.51, from 19.35 to 27.99, from 27.10 to 30.59, from 16.42 to 30.49 and from 16.12 to 27.19, for TaqManPsa, by TaqManPsab1, by TaqManPsab2, by TaqManPsab3 and by TaqManPsaf, respectively (Table 4). All the non-target strains were detected negative for each TaqMan assay (Table 4).

Each TaqMan assay detected all the target strains for all the repeats, which indicated a specificity of 100 %. Each TaqMan assay generated negative responses for all non-target strains that revealed an exclusivity of 100 %.

The specificity of the five TaqMan assays was tested on a collection of 416 strains (including the strains used for specificity assays) on high-throughput real-time PCR system (LightCycler 1536 (Roche)) in final reaction volume of 2 μ L. For all TaqMan assays, a cycle cut-off equal to 30 was determined as the limit of positive values. TaqManPsa assay detected all the 353 target strains with Ct values range from 9.68 to 29.63. The variation between Ct values could be explained by different DNA concentrations due to the origin of the DNA strains. Non-

target strains provided negative results. All of the 8 target strains were detected with the TaqManPsa₁ assay, Ct values varied from 15.66 to 22.69. TaqManPsa₂ assay detected the 3 target strains with Ct values range from 24.93 to 26.33. The 342 target strains were all detected with the TaqManPsa₃ assay and their Ct values ranged from 9.80 to 29.08. On the 39 target strain of the TaqManPsa_f, all were detected with Ct values range from 17.64 to 29.79. Non-target strains gave negative reaction with the TaqManPsa, TaqManPsa₁, TaqManPsa₃ and TaqManPsa_f. Six non-target strains (LSV 37.37; LSV 37.39; LSV38.15; CFBP 4287; CFBP 4288; CFBP 4290) gave positive results for TaqManPsa₂, with Ct values ranged from 19.66 to 29.31. These six strains were tested in duplicates in a final volume of 20 μ L on the CFX96 (Bio-Rad). Positive detections were confirmed for all the six strains and for all the repeats.

Tests on naturally infected samples

Naturally infected samples of wood (12) and leaves (13) of *A. deliciosa* and *A. chinensis*, collected in orchards in France were used to validate all PCR reactions. Biochemical tests and a duplex-PCR Gallelli (Gallelli et al., 2011) confirmed that all wood samples and 12 leaf samples were infected with *Psa* biovar3 and one leaf with *Psa_f* (data not shown). All wood samples were detected positive with TaqManPsa and TaqManPsa₃, with Ct values ranging from 14.84 to 22.30 and from 15.52 to 22.87, respectively (Table 5). The 12 leaf samples infected with *Psa* biovar 3 were detected positive with TaqManPsa and TaqManPsa₃, with Ct values range from 18.89 to 25.74 and from 19.48 to 26.11, respectively (Table 5). The TaqManPsa_f gave positive result only on the leaf sample contaminated with *Psa_f*, with Ct value equal to 24.38 (Table 5).

Discussion

Development of simplex TaqMan assays to target kiwifruit pathogens

Psa biovar 3, recently detected, spread across kiwifruit producing countries. It will probably impact the kiwifruit production for the next years (Greer, 2012). Even if *Psa* biovar 1 and 2 have been no more detected to date, it would be relevant to be able to detect them, in the case of a re-emergence of these biovars. Another kiwifruit pathogen, *Psaf*, was detected during the outbreak of *Psa* biovar3. The pathovar *actinidifoliorum* causes similar, undistinguishable symptoms on leaves as the pathovar *actinidiae*, but the presence of *Psaf* in a kiwifruit orchard causes no yield loss, whereas *Psa* does (Vanneste et al., 2013, Cuntly et al., 2015). It is valuable input to be able to distinguish these two pathovars, in order to apply efficient and well adapted control measures in the orchard. We developed five TaqMan assays with primer pairs targeting independently the three biovars of *Psa* (TaqManPsab1, TaqManPsab2, TaqManPsab3), the pathovar *actinidia* in its whole (TaqManPsa) and the pathovar *actinidifoliorum* in its whole (TaqManPsaf). Each primer pair was designed on a gene specific to the targeted group. Comparative genomic studies of *Psa* and *Psaf* strains isolated worldwide revealed unique effector gene repertoires for the pathovar *actinidiae*, *Psa* biovar 1 and biovar 3 (Marcelletti et al., 2011, McCann et al., 2013). In these repertoires, the effector genes *hopZ3*, *hopH1* and *hopZ5* were chosen to develop specific TaqMan assays as TaqManPsa, TaqManPsab1 and TaqManPsab3, respectively. Balestra *et al.* (Balestra *et al.*, 2013), used successfully the effector gene *hopZ3* to design a primer pair for a conventional PCR, already, but the amplicon size generated was too long to be used in TaqMan assay. In this study, new primers were designed to obtain amplicon with sizes inferior to 150 pb. Comparative genomic analysis conducted on *Psa* and *Psaf* strains allowed us to find a gene specific to *Psa* biovar 2 and a gene specific to all lineages of *P. s. pv. actinidifoliorum*, each gene encoding a hypothetical protein with unknown function. Nucleic blasts performed on NCBI revealed the high *in silico* specificity of the five retained sequences. ,

Efficiency and sensitivity of the TaqMan assays

The amplification efficiencies of all reactions ranged from 95.59% to 109.18%, based on the analysis of artificially contaminated wood with the 10-fold dilution bacterial suspensions. Under these high-efficiency conditions, the sensitivity recorded on artificially contaminated wood samples ranged between 1.10^4 CFU/mL and 1.10^5 CFU/mL, corresponding to 20 and 200 CFU per PCR reaction, respectively. These results are in accordance with the sensitivity threshold of the real-time PCR assay developed by Gallelli *et al.*, (Gallelli et al., 2013), which was of 20 CFU per PCR reaction. All assays were tested on naturally contaminated samples of wood and leaves of *A. chinensis* or *A. deliciosa*. The samples were first analyzed with biochemical tests and duplex-PCR assay of Gallelli *et al.* (Gallelli et al., 2013). This revealed infections by *Psa* biavar 3 or *Psaf*. These samples were positive with the TaqManPsa and TaqManPsab3, and with the TaqManPsaf, respectively. No positive reaction was obtained for the non-specific TaqMan assays of the target organism. Thus the TaqMan assays developed here can be used on low contaminated wood and leaves samples of kiwifruit

All TaqMan assays show high specificity

The specificity of the amplicon generated by each primers pair was first checked *in silico* by nucleic BLAST on NCBI. At this stage, the specificity was of 100% for each TaqMan assays. Then, analytical specificity was assayed on a small strain collection. Positive results were obtained only for target strains and negative results for non-target strains, corresponding to inclusivity and exclusivity of 100 % for each TaqMan assays. In order to test the specificity at a large scale, the five TaqMan assays were performed on a collection of 416 strains, including target and non-target strains

The 100% specificity was confirmed for TaqManPsa, TaqManPsab1, TaqManPsab3 and TaqManPsaf. However, the TaqManPsab2 detected six false positives, corresponding to three strains of *Psa* biovar 3 isolated in France in 2011 and three *Pseudomonas syringae* strains isolated from kiwifruit in 1985 by Jean-Luc Gaignard (personal communication). The analysis of the partial sequences of two housekeeping genes *gyrB* and *rpoD*, indicated that these strains were genetically closely related to *Ps* pv. *syringae* CFBP 4702^T, and distant from *Psa* biovar 2 strains. The use of the combination of TaqManPsa TaqManPsab2 allowed concluding that the strains did not belong to the pathovar *actinidiae*.

Detection from naturally infected wood and leaves

We showed that TaqManPsa, TaqManPsa3 and TaqManPsaf assays allowed detecting the bacteria from naturally infected wood and leaf samples. As *Psa* biovar 1 and 2 are absent in France, no kiwifruit samples, naturally infected by these biovars, have been tested in this study. However, we confirmed that TaqManPsa1 and TaqManPsa2 did not give false positive with naturally infected samples by *Psa* biovar 3 or *Psaf*.

Afin de pouvoir évaluer la concentration bactérienne des échantillons il faudrait refaire les expériences à partir d'échantillons contaminés en pesant le matériel végétal de départ pour pouvoir évaluer une contamination en cellules par g de végétal.

A tool to detect new *Psa* biovar

Recently in Japan, a new *Psa*, called *Psa* biovar 5, was identified. We can hypothesize that if a new emerging biovar is closely related to the biovar 1, 2 or 3, it should also possess the effector gene *hopZ3*. Since it is known that effector genes are involved in pathogenicity of bacteria and can be exchanged among other bacteria by horizontal transfer, the most parsimonious hypothesis is that the effector gene *hopZ3* was already present in the genome of

the ancestor of the three biovars of *Psa*. Using the TaqManPsa developed here would allow detecting the presence of such an effector in this new biovar. In order to confirm this hypothesis, TaqManPsa assay should then be conducted on *Psa* 5 strains isolated in Japan. In the same way, strains of *Psaf* were recently identified in Spain (Abelleira et al., 2015). They were also closely related to the four lineages previously described but they probably belonged to a new one. In order to confirm the high specificity of TaqManPsaf, it would be useful to test it on these strains.

Conclusion

Here we proposed a new sensitive and highly specific set of assays to detect pathogens of kiwifruit based on simple real-time PCR. If the TaqManPsa gives a positive result, it is also possible to identify the strain at the biovar level with TaqManPsab1, TaqManPsab2, and TaqManPsab3 assays. This second step of identification can also be seen as a confirmation of the first one. In case of negative result with the TaqManPsa assay, the presence of *Psaf* can be tested with TaqManPsaf. These assays shall represent valuable tools in epidemiological surveys to follow-up the spread of the pathogens and the prevalence of particular type of strains in newly infected areas.

Acknowledgements

We thank Corinne Audusseau and Sandrine Paillard for the isolation of *Psa* and *Psaf* strains, Perrine Portier and Géraldine Taghouti at the International Centre for Microbial Ressources and Plant-associated Bacteria (CIRM-CFBP), International Collection of Microorganisms from Plants (ICMP) Pr J. L. Vanneste of Plant & Food Research Limited, Ruakura Research Center, New Zealand, Pr M. Scortichini and Dr S. Loreti of CRA and CRA-PAV, Roma, Italy, Pr Gorgio Balestra of DAFNE, Viterbo, Italy, Dr A. Calzolari, Servizio Fitosanitario,

Bologna, Italy and Pr Liwu Zhu of the Key Laboratory of Pomology, Anhui Agricultural University, Hefei, China, for providing bacterial strains. We thank Martial Briand for the bio-informatic analyses, Sabine Delanoy and Patrick Fach of the Anses's IdentityPath for the assay on the high throughput qPCR at IdentityPath platform. A. Cuntty is supported by a fellowship provided by Anses and the Region Pays de la Loire, France.

References

- Abelleira A, Ares A, Aguin O, *et al.*, 2015. Detection and characterisation of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* in kiwifruit in Spain. *Journal of Applied Microbiology* **in press**.
- Anonymous, 2003. In: AFNOR (Ed.), Microbiology of fodds and animal feeding stuffs - protocol for the validation of alternative methodss. *La Plaine Saint Denis, France (EN ISO 16140)*.
- Anonymous, 2010. EPPO standards - use of EPPO diagnostic protocols. In: *EPPO (Ed.), EPPO Bull.* **40**, pp. 350-2 (PM7/76(2)).
- Balestra GM, Mazzaglia A, Quattrucci A, Renzi M, Rossetti A, 2009. Current status of bacterial canker spread on kiwifruit in Italy. *Australasian Plant Disease Notes* **4**, 34-6.
- Balestra GM, Taratufolo MC, Vinatzer BA, Mazzaglia A, 2013. A Multiplex PCR Assay for Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and Differentiation of Populations with Different Geographic Origin. *Plant Disease* **97**, 472-8.
- Biondi E, Galeone A, Kuzmanović N, Ardizzi S, Lucchese C, Bertaccini A, 2013. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* detection in kiwifruit plant tissue and bleeding sap. *Annals of Applied Biology* **162**, 60-70.
- Butler M. I. SPA, Black M. A., Day R. C., Lamont I. L., Poulter R. T. M., 2013. *Pseudomonas syringae* pv. from Recent Outbreaks of Kiwifruit Bacterial Canker Belong to Different Clones That Originated in China. *PLoS ONE* **8**, 1-18.
- Chapman JR, Taylor RK, Weir BS, *et al.*, 2012. Phylogenetic relationships among global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Phytopathology* **102**, 1034-44.
- Cuntty A, Poliakoff F, Rivoal C, *et al.*, 2015. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) isolated from France and assignment of Psa biovar 4 to a de novo

- pathovar: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov. *Plant Pathology* **64**, 582-96.
- Eppo, 2011. *First report of Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Australia
- Gallelli A, L'aurora A, Loreti S, 2011. Gene sequence analysis for the molecular detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: developing diagnostic protocols. *Journal of Plant Pathology* **93**, 425-35.
- Gallelli A, Talocci S, Pilotti M, Loreti S, 2014. Real-time and qualitative PCR for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolates causing recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker. *Plant Pathology* **63**, (1), 12-9.
- Gardan L, Shafik H, Belouin S, Broch R, Grimont F, Grimont P, 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov.(ex Sutic and Dowson 1959). *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 469-78.
- Greer S, C, 2012. The costs of PsA-V to the New Zealand kiwifruit industry and the wider community. In: Report AaERU, ed. Lincoln, New Zealand, 75p.
- Koh Y, Cha B, Chung H, Lee D, 1994. Outbreak and spread of bacterial canker of kiwifruit. *Korean Journal of Plant Pathology* **10**, 68-72 (Abstract).
- Koh YJ, Kim GH, Koh HS, Lee YS, Kim SC, Jung JS, 2012. Occurrence of a New Type of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Strain of Bacterial Canker on Kiwifruit in Korea. *The Plant Pathology Journal* **28**, 423-7.
- Koh YJ, Nou IS, 2002. DNA markers for identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Molecules and cells* **13**, 309.
- Li L, Stoeckert CJ, Roos DS, 2003. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome research* **13**, 2178-89.
- Marcelletti S, Ferrante P, Petriccione M, Firrao G, Scortichini M, 2011. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* draft genomes comparison reveal strain-specific features involved in adaptation and virulence to *Actinidia* species. *PLoS ONE* **6**, e27297.
- Mazzaglia A, Studholme DJ, Taratufolo MC, et al., 2012. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) isolates from recent bacterial canker of kiwifruit outbreaks belong to the same genetic lineage. *PLoS ONE* **7**, e36518.
- Mccann HC, Rikkerink EH, Bertels F, et al., 2013. Genomic Analysis of the Kiwifruit Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Provides Insight into the Origins of an Emergent Plant Disease. *PLoS Pathog* **9**, e1003503.

- Rees-George J, Vanneste JL, Cornish DA, *et al.*, 2010. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S–23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions. *Plant Pathology* **59**, 453-64.
- Rozen S, Skaletsky H, 1999. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In. *Bioinformatics methods and protocols*. Springer, 365-86.
- Sawada H, Miyoshi T, Ide Y, 2014. Novel MLSA group (Psa 5) of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in Japan. *Japanese Journal of Phytopathology* **80**, 171-84.
- Scortichini M, 1994. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. *Plant Pathology* **43**, 1035-8.
- Scortichini M, Marcelletti S, Ferrante P, Petriccione M, Firrao G, 2012. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multi-faceted, pandemic pathogen. *Mol Plant Pathol* **13**, 631-40.
- Takikawa Y, Serizawa S, Ichikawa T, Tsuyumu S, Goto M, 1989. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: the causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **55**, 437-44.
- Taylor R, Guilford P, Clark R, Hale C, Forster R, 2001. Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **29**, 35-43.
- Vanneste J, 2013. Recent progress on detecting, understanding and controlling *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a short review. *New Zealand Plant Protection* **66**, 170-7.
- Vanneste JL, Yu J, Cornish DA, *et al.*, 2013. Identification, Virulence, and Distribution of Two Biovars of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in New Zealand. *Plant Disease* **97**, 708-19.
- Wang Z, Tang X, Liu S, 1992. Identification of the pathogenic bacterium for bacterial canker on *Actinidia* in Sichuan. *J. Southwest Agricultural University*, unpaginated. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-XNND199206007.htm.

Table 1. List of strains used in this study.

Strain code	Nomenclature	Biovar	Host	Year of isolation	Country of isolation	Reference
CFBP 4909 ^{PI,ab}	ICMP 9617 ^{ab}	1	<i>A. deliciosa</i>	1984	Japan	Takikawa <i>et al.</i> (1989)
ICMP 19068 ^b	Wal ^b	1	<i>A. deliciosa</i>	1988	Japan (Wakayama)	Takikawa <i>et al.</i> (1989)
ICMP 19070 ^{ab}	Kw4 ^{ab}	1	<i>A. deliciosa</i>	1987	Japan (Kanagawa)	Takikawa <i>et al.</i> (1989)
ICMP 19102 ^{ab}	MAFF 302133 ^{ab}	1	<i>A. arguta</i>	1987	Japan (Kanagawa)	Takikawa <i>et al.</i> (1989)
ICMP 19103 ^b	MAFF 302134 ^b	1	<i>A. arguta</i>	1987	Japan (Kanagawa)	Takikawa <i>et al.</i> (1989)
ICMP 19104 ^b	MAFF 302146 ^b	1	<i>A. deliciosa</i>	1988	Japan (Wakayama)	Takikawa <i>et al.</i> (1989)
ICMP 9854 ^b	KW40 ^b / CFBP 4911 ^b	1	<i>A. deliciosa</i>	1984	Japan (Shizuoka)	Takikawa <i>et al.</i> (1989)
NCPPB 3873 ^{ab}		1	<i>A. deliciosa</i>	1992	Italy	Chapman <i>et al.</i> (2012)
ICMP 19071 ^{ac}		2	<i>A. chinensis</i>	1992	Korea	Koh <i>et al.</i> (1994), Chapman <i>et al.</i> (2012)
ICMP 19072 ^{ac}	KACC10584 ^{ac}	2	<i>A. chinensis</i>	1997	Korea (Jeonnam)	Koh <i>et al.</i> (1994), Chapman <i>et al.</i> (2012)
ICMP 19073 ^{ac}	KACC10594 ^{ac}	2	<i>A. chinensis</i>	1998	Korea (Jeonnam)	Koh <i>et al.</i> (1994), Chapman <i>et al.</i> (2012)
10638		3	<i>A. chinensis</i>	2010	New Zealand	J. Vanneste
10787		3	<i>A. deliciosa</i>	2010	New Zealand	J. Vanneste
11266		3	<i>A. deliciosa</i>	2010	New Zealand	J. Vanneste
11268		3	<i>A. deliciosa</i>	2010	New Zealand	J. Vanneste
11282		3	<i>A. deliciosa</i>	2010	New Zealand	J. Vanneste
11283		3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	New Zealand	J. Vanneste
11287		3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	New Zealand	J. Vanneste
11290		3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	New Zealand	J. Vanneste
11293		3	<i>A. deliciosa</i>	2010	New Zealand	J. Vanneste
11298		3	<i>A. deliciosa</i>	2011	New Zealand	J. Vanneste
1.1		3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
1.2		3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
1.A		3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
1.B		3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste

1.D	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
1.E	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
10.6	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
13093^{ad}	<i>Psa</i>	3	<i>A. arguta</i>	2011	New Zealand	J. Vanneste
17460,1 / LSV 46.19	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	Italy	A. Calzolari
17704,1 / LSV 46.20	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	Italy	A. Calzolari
2.1	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
2.2	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
2.9	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
2E	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
3.2	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
3.8	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
4.1	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
4.2	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
4.4	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
4.6	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
6.6	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
AHPP1	<i>Psa</i>	3	<i>Philagra sp</i>	2012	China (Anhui)	L. Zhu
CFBP 7287 ^d / LSV 40.47 ^d	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2008	Italy (Latina)	Balestra <i>et al.</i> (2009), Vanneste <i>et al.</i> (2013)
CFBP 7811 ^{ad} / 10627 ^{ad}	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2010	New Zealand	Vanneste <i>et al.</i> , 2013
CFBP 7906	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 7910	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8025 ^d	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2010	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8026 ^{ad}	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8027	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8028	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8029	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2010	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)

CFBP 8030	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2010	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8031 ^{ad}	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8032 ^d	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2011	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8033	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8034	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8035	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8036	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8037	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8047	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8052	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8053	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8054	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8055	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8056	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8057	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8058	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8059	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8060	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8061	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8062 ^{ad}	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2012	France (PACA)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8063	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8064 ^d	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Poitou-Charentes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)

CFBP 8065	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8066	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Midi-Pyrénées)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8087	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8088	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8089	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8090	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8091	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Midi-Pyrénées)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8092	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8094	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8095	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8096	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Midi-Pyrénées)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8097	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8098	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8099	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8100	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Midi-Pyrénées)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8101	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8102	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8103	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8108	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Poitou-Charentes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8109	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Poitou-Charentes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8110 ^d	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Poitou-Charentes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CORE	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
D1	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy (Agrintesa)	J. Vanneste
D3-b	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy (Agrintesa)	J. Vanneste

D4	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy (Agrintesa)	J. Vanneste
E4	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy (Contarino)	J. Vanneste
E7	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy (Contarino)	J. Vanneste
E-AB	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy (Contarino)	J. Vanneste
GC31	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	China (Guizhou)	L. Zhu
H1.2	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
H1.3	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
H1.4	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
H2.1	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
H2.2	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
H2.3	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
HW3 ^{ad}	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	China (Shaanxi)	J. Vanneste
ICMP 18743 ^{ad} / CRA-FRU 11.40	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	Italy (Rome)	L. Zhu
ICMP 18744 / CRA-FRU 11.41	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	Italy (Rome)	Butler et al. (2013)
ICMP 18745 / CRA-FRU 11.42	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2010	Italy (Latina)	
ICMP 18746 / CRA-FRU 11.43	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2010	Italy (Latina)	
ICMP 19078	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2010	Italy (Latina)	
ICMP 19439 ^{ad}	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	Chile	Butler et al. (2013)
ICMP 19455	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	Chile	Butler et al. (2013)
ICMP 19457	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	Chile	Butler et al. (2013)
JF8 ^d	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	China (Anhui)	L. Zhu
JZGMC1	<i>Psa</i>	3	<i>Alternanthera philoxeroides</i>	2013	China (Anhui)	L. Zhu
L1	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
L2	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
L3	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
LSV 36.45	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 36.46	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	France (Rhône-Alpes)	This study

LSV 36.47	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 36.67	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 36.68	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 36.69	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2010	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 37.13	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study
LSV 37.14	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.17	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.18	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.19	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.21	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.24	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 37.25	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.26	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.29	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.31	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.32	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.33	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study
LSV 37.34	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.36	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.37	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study
LSV 37.38	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 37.41	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study
LSV 37.42	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study

LSV 37.43	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.51	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.52	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.55	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.58	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 37.63	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.64	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.65	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.66	<i>Psa</i>	3	<i>A. arguta</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.68	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.69	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study
LSV 37.73	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.75	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.76	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.77	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.78	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.79	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 37.80	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 38.01	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 38.02	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 38.03	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 38.04	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 38.05	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 38.06	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 38.08	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (PACA)	This study
LSV 38.09	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study

LSV 38.11	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 38.12	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 38.13	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 38.14	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 38.15	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 38.16	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 38.19	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 38.22	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 38.79	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (PACA)	This study
LSV 38.80	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (PACA)	This study
LSV 39.02	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study
LSV 39.03	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 39.06	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 39.11	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 39.12	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study
LSV 39.13	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study
LSV 39.14	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 39.23	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 39.24	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 39.25	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 39.26 ^d	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Centre)	This study
LSV 39.28	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 39.29	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 39.30	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 39.36	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 39.38	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 39.39	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study

LSV 39.40	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 39.41	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 39.44	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study
LSV 39.45	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study
LSV 39.66 / CFBP 7285	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2008	Italy (Treviso)	Balestra <i>et al.</i> (2009), Vanneste <i>et al.</i> (2013)
LSV 39.76	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 40.10	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 40.11	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 40.13	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2011	France (Midi-Pyrénées)	This study
LSV 40.20	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 40.22	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 40.23	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 40.30	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2011	France (Aquitaine)	This study
LSV 40.33	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 40.34	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 40.46 / CFBP 7286	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2008	Italy (Latina)	Balestra <i>et al.</i> (2009), Vanneste <i>et al.</i> (2013)
LSV 40.52	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 40.53	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 40.58	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 40.61	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 40.62	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 40.63	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study

LSV 40.64	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 40.65	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 40.66	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 40.67	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 40.69	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 40.70	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 40.71	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 40.73	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 40.81	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.06	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.08	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.09	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.10	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.12	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Midi-Pyrénées)	This study
LSV 41.13	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.15	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.16	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.17	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Midi-Pyrénées)	This study
LSV 41.18	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.19	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.20	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.22	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.23	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.24	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study

LSV 41.25	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.26	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.28	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.29	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.32	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.34	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.35	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.36	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.37	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.38	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.39	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.41	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.42	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.49	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Midi-Pyrénées)	This study
LSV 41.50	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.51	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.52	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.55	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.56	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.57	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.62	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 41.67	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Midi-Pyrénées)	This study
LSV 42.16	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Aquitaine)	This study
LSV 42.20	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 42.22	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 42.23	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Rhône-Alpes)	This study

LSV 42.44	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Midi-Pyrénées)	This study
LSV 42.45	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Midi-Pyrénées)	This study
LSV 42.58	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 42.59	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 42.61	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 42.63	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Midi-Pyrénées)	This study
LSV 42.64	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Midi-Pyrénées)	This study
LSV 42.67	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 42.68	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 42.69	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 42.70	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 42.71	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 42.72	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 42.76	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 42.77	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 42.78	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 42.79	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 42.80	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 42.81	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.05	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.15	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.16	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.17	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.25	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.26	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.27	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.29	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-	This study

LSV 43.30	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 43.34	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Midi-Pyrénées)	This study
LSV 43.35	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Midi-Pyrénées)	This study
LSV 43.36	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.37	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.38	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.53	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.54	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.55	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.56	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.57	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.58	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.59	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.66	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.67	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.68	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.69	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.75	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.77	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.78	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 44.06	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 44.07	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 44.08	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 44.17	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 44.18	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 44.22	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 44.23	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study

LSV 44.31	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 44.46	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 44.47	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 44.48	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 44.49	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 44.52	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 44.53	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 44.54	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 44.55	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 44.56	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 44.61	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 44.62	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Rhône-Alpes)	This study
LSV 46.18 / 16803,1	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	Italy	A. Calzolari
LSV 46.21 / 21375,1	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	Italy	A. Calzolari
LSV 46.22 / 21726,1	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	Italy	A. Calzolari
LSV 46.23 / 21736,1	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2013	Italy	A. Calzolari
Psa Ic	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy (Italy)	J. Vanneste
SCHY9	<i>Psa</i>	3	<i>A. deliciosa</i>	2012	China (Sichuan)	L. Zhu
SH8	<i>Psa</i>	3	<i>A. chinensis</i>	2013	China (Shanghai)	L. Zhu
SP3	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
T4	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
T5	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste

T6	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
UOM1	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
UOM2	<i>Psa</i>	3	<i>Actinidia</i> sp.	2010	Italy	J. Vanneste
WT2	<i>Psa</i>	3	<i>Paulownia fortunei</i>	2013	China (Anhui)	L. Zhu
CFBP 7812° / ICMP19098°	<i>Psaf</i>		<i>A. chinensis</i>	2010	New Zealand	Vanneste et al., 2013
CFBP 7901° / ICMP 18803°	<i>Psaf</i>		<i>A. chinensis</i>	2010	New Zealand	Chapman et al. (2012), Cunty et al. (2014)
CFBP 7902 / ICMP 18804	<i>Psaf</i>		<i>A. chinensis</i>	2010	New Zealand	Chapman et al. (2012), Cunty et al. (2014)
CFBP 7903 / ICMP18882	<i>Psaf</i>		<i>A. chinensis</i>	2010	New Zealand	Chapman et al. (2012), Cunty et al. (2014)
CFBP 7904 / ICMP 18883	<i>Psaf</i>		<i>A. chinensis</i>	2010	New Zealand	Chapman et al. (2012), Cunty et al. (2014)
CFBP 7907°	<i>Psaf</i>		<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Pays	Cunty et al. (2014)
CFBP 7908°	<i>Psaf</i>		<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	Cunty et al. (2014)
CFBP 7909°	<i>Psaf</i>		<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Poitou- Charentes)	Cunty et al. (2014)
CFBP 7950 / ICMP 18806	<i>Psaf</i>		<i>A. deliciosa</i>	2011	New Zealand	Butler et al. (2013), Cunty et al. (2014)
CFBP 7951° / ICMP 18807°	<i>Psaf</i>		<i>A. deliciosa</i>	2011	New Zealand	Butler et al. (2013), Cunty et al. (2014)
CFBP 8038	<i>Psaf</i>		<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Poitou- Charentes)	Cunty et al. (2014)
CFBP 8039	<i>Psaf</i>		<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Aquitaine)	Cunty et al. (2014)
CFBP 8040	<i>Psaf</i>		<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Pays	Cunty et al. (2014)
CFBP 8041	<i>Psaf</i>		<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Pays	Cunty et al. (2014)
CFBP 8042	<i>Psaf</i>		<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Pays	Cunty et al. (2014)
CFBP 8043	<i>Psaf</i>		<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Pays	Cunty et al. (2014)
CFBP 8044° / ICMP 19440°	<i>Psaf</i>		<i>A. chinensis</i>	2010	Australie (Australie)	Chapman et al. (2012), Cunty et al. (2014)
CFBP 8045/ ICMP 19486	<i>Psaf</i>		<i>A. chinensis</i>	2010	Australie	Chapman et al. (2012), Cunty et al. (2014)
CFBP 8046 / ICMP 19441	<i>Psaf</i>		<i>A. chinensis</i>	2010	(Australie)	Chapman et al. (2012), Cunty et al. (2014)
CFBP 8048	<i>Psaf</i>		<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Pays	Cunty et al. (2014)
CFBP 8049	<i>Psaf</i>		<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Pays	Cunty et al. (2014)
CFBP 8050	<i>Psaf</i>		<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Pays	Cunty et al. (2014)

CFBP 8051	<i>Psaf</i>	<i>A. deliciosa</i>	2011	France (Pays)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8067 ^e	<i>Psaf</i>	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Pays)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8085	<i>Psaf</i>	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Pays)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8086	<i>Psaf</i>	<i>A. deliciosa</i>	2012	France (Pays)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8104	<i>Psaf</i>	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Poitou-Charentes)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8105 ^e	<i>Psaf</i>	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Pays)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8106 ^e	<i>Psaf</i>	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Pays)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8107 ^e	<i>Psaf</i>	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8160 ^e	<i>Psaf</i>	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Centre)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
CFBP 8161 ^e	<i>Psaf</i>	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Centre)	Cunty <i>et al.</i> (2014)
LSV 43.28 ^e	<i>Psaf</i>	<i>A. chinensis</i>	2013	France (Limousin)	This study
LSV 43.40 ^e	<i>Psaf</i>	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Aquitaine)	This study
LSV 43.43	<i>Psaf</i>	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Limousin)	This study
LSV 43.44	<i>Psaf</i>	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Limousin)	This study
LSV 43.65	<i>Psaf</i>	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Mayenne)	This study
LSV 43.74	<i>Psaf</i>	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Mayenne)	This study
LSV 44.20	<i>Psaf</i>	<i>A. deliciosa</i>	2013	France (Pays)	This study
CFBP 2216 ^{PTf}	<i>Ps</i> pv. <i>coronofasciens</i>	<i>Avena sativa</i>	1958	United Kingdom	(Elliott 1920) Young, Dye et Wilkie 1978
CFBP 2067 ^{PTf}	<i>Ps</i> pv. <i>helianthi</i>	<i>Heliantus annuus</i>		Mexico	(Kawamura 1934) Young, Dye et Wilkie 1978.
CFBP 2351 ^{PTf}	<i>Ps</i> pv. <i>mor-sprunorum</i>	<i>Prunus domestica</i>		United States of America	(Wormald 1931) Young, Dye et Wilkie 1978.
CFBP 1390 ^{PTf}	<i>Ps</i> pv. <i>phaseolicola</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1949	Canada	(Burkholder 1926) Gardan, Bollet, Abu Ghorrah, Grimont et Grimont 1992.
CFBP 2212 ^{PTf}	<i>Ps</i> pv. <i>tomato</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1960	United Kingdom	(Okabe 1933) Young, Dye et Wilkie 1978
CFBP 4702 ^{Tf}	<i>Pss</i>	<i>Syringa vulgaris</i>	1950	United Kingdom	Van Hall 1902
CFBP 1232 ^{Tf}	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Pyrus communis</i>	1959	United Kingdom	(Burrill 1882) Winslow et al. 1920 (Approved Lists 1980), species.
CFBP 4060 ^{Tf}	<i>P avellanae</i>	<i>Corylus avellana</i>	1976	Greece	Janse et al. 1997, sp. nov..

CFBP 2341 ^{Tf}	<i>P. cannabina</i> pv. <i>cannabina</i>	<i>Cannabis sativa</i>	1957	Hungary	(ex Sutin and Dowson 1959) Gardan et al. 1999, sp. nov., nom. rev..
CFBP 3229 ^{Tf}	<i>P. tremae</i>	<i>Tremae orientalis</i>	1979	Japan	Gardan et al. 1999, sp. nov.
CFBP 2107 ^{Tf}	<i>P. viridiflava</i>	<i>Phaseolus sp.</i>	1927	Switzerland	(Burkholder 1930) Dowson 1939 (Approved Lists 1980), species.
CFBP 4284	<i>Ps</i>	<i>A. sp</i>	1985	France (Pays de la Loire)	Gaignard
CFBP 4285	<i>Ps</i>	<i>A. sp</i>	1985	France (PACA)	Gaignard
CFBP 4286	<i>Ps</i>	<i>A. sp</i>	1985	France (Pays de la Loire)	Gaignard
CFBP 4287	<i>Ps</i>	<i>A. sp</i>	1985	France (Centre)	Gaignard
CFBP 4288	<i>Ps</i>	<i>A. sp</i>	1985	France (Centre)	Gaignard
CFBP 4290	<i>Ps</i>	<i>A. sp</i>	1985	France (Aquitaine)	Gaignard
CFBP 4291	<i>Ps</i>	<i>A. sp</i>	1985	France (Aquitaine)	Gaignard
CFBP 4292	<i>Ps</i>	<i>A. sp</i>	1985	France (Rhône-Alpes)	Gaignard
CFBP 4293	<i>Ps</i>	<i>A. sp</i>	1985	France (Rhône-Alpes)	Gaignard
CFBP 1660 ^{PTf}	<i>Ps</i> pv. <i>primulae</i>	<i>Primula sp.</i>		United States of America	(Ark et Gardner 1936) Young, Dye et Wilkie 1978
CFBP 2348 ^{PTf}	<i>Ps</i> pv. <i>ribicola</i>	<i>Ribes aureum</i>	1961		(Bohn et Maloit 1946) Young, Dye et Wilkie 1978.
CFBP 2353 ^{PTf}	<i>Ps</i> pv. <i>theae</i>	<i>Thea sinensi</i>	1970	Japan	(Hori 1915) Young, Dye et Wilkie 1978.
CFBP 2528 ^{Tf}	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>Juglandis</i>	<i>Juglans regia</i>	1956	New Zealand	(Pierce 1901) Vauterin, Hoste, Kersters et Swings 1999

CFBP: Collection Française de Bactéries associées aux Plantes; CRA-FRU : Centro di Ricerca Agronomica per la Fruti; ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants ; LSV : Laboratoire de la santé des végétaux. Haplotypes was indicated with number for *Psa* biovar 3 strains and with letter for *Psaf* strains. PACA: Provence-Alpes-Côte-d'Azur.

Target strains used to evaluate the specificity of the primers targeting *Psa* (^a); *Psa* biovar 1 (^b); *Psa* biovar 2 (^c); *Psa* biovar 3 (^d); *Psa* biovar 3 (^e); Non target strains to evaluate the specificity of all the primers (^f); T: type stains; PT: pathotype strains. In bold: DNA extraction performed by thermal lysis with unknown starting concentration, but more than 1. 10⁸ CFU/mL.

Table 2. Primers and probes used in this study.

Target organism	Target gene	Strain used for design	Contig number	Oligo name	Position in the contig (start_end)	Primer sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
Psa	HopZ3	CFBP 7286	AGNO01000134.1	Z3-23F	7698_7720	CCTCTGCAGACTCAAAACATCACA	124
				Z3-146R	7821_7804	CAACCGCTGAACATGCGC	
				Z3-59P*	7733_7759	TGCCCCGGCCCTCATTTGGATATCCAGC	
Psa b1	HopH3	NCPP B3871	AFTF01000008.1	H3-99F	560_579	AAGAAGCCGACCAAGTGGCA	134
				H3-232R	693_672	TCTGCTGCTTTTCGGTTAGGCA	
				H3-182P*	643_669	ACAATAGCGATGATCCTGGGGCGCGCC	
				PH-882F	10677_10696	GCCGTCGGCTTGTACGTGAG	
Psa b2	Hypothetical protein	ICMP 19071	AOJS01000055.1	PH1007-R	10802_10783	CGACAGGGTCAACCAGCAGGA	126
				PH-917P	10711_10736	TGGCAACGCCGATGCTGCTGCTGATC	
				Z5-501F	1660_1679	CATTGAGTCTGGCGTGGCGT	
Psa b3	HopZ5	CFBP 7286	AGNO0100101.1	Z5-612R	1170_1151	CATGCGGCCGTTATCCTGAGC	112
				Z5-533P*	1692_1718	ACAATGCCACCGGATTCCTGCCTGGCT	
				psaf_5540F	58624_58642	TCGTAGCACCAAAACCAGCA	
Psaf	Hypothetical protein	CFBP 8161	L.JFL0100012.1	psaf_5540R	58704_58724	GGCGACTTCTTTCTCGGTAAAG	118
				psaf_5540P*	58662_58689	TGGATCTGACGTTTCGAAAGTCCAAGGCA	

*probes are labelled with with a 5'-end reporter dye (FAM) and a 3'-end quencher dye (BHQ-1).

Table 3. Efficiency and analytical sensitivity of the TaqMan assays

TaqMan assay	E (%) ^a	R ^{2b}	Slope ^c	Y = int ^d	Detection limit	Detection limit per PCR reaction
TaqManPsa	100.66	0.985	3.306	45.94	1.10 ⁴ CFU/mL	20 CFU
TaqManPsab1	95.59	0.982	3.432	45.79	1.10 ⁴ CFU/mL	20 CFU
TaqManPsab2	102.69	0.851	3.259	47.91	1.10 ⁵ CFU/mL	200 CFU
TaqManPsab3	107.54	0.987	3.153	45.73	1.10 ⁴ CFU/mL	20 CFU
TaqManPsaf	109.18	0.914	3.120	48.81	1.10 ⁵ CFU/mL	200 CFU

^a : PCR efficiency, ^b : estimation of the repeatability with 1 as the best fit, ^c : angular coefficient (m) of the standard curve ($y=mx+b$), ^d : the value of Ct where the curve crosses the y-axis.

Table 4. Results obtained for the specificity assay of the five TaqMan assays on target strains.

Strain code	Nomenclature	qPCR _{Ps} a			qPCR _{Ps} ab1			qPCR _{Ps} ab2			qPCR _{Ps} ab3			qPCR _{Ps} saf	
		Run 1 ^a	Run 2 ^a	Run 3 ^a	Run 1 ^a	Run 2 ^a	Run 3 ^a	Run 1 ^a	Run 2 ^a	Run 3 ^a	Run 1 ^a	Run 2 ^a	Run 3 ^a	Run 1 ^a	Run 2 ^a
CFBP 4909	<i>Ps</i> a b1	21.50	21.39	20.49	20.78	23.72									
ICMP 19068	<i>Ps</i> a b1			21.85	21.53	22.02									
ICMP 19070	<i>Ps</i> a b1	21.58	22.03	21.23	21.33	27.99									
ICMP 19102	<i>Ps</i> a b1	22.51	22.40	21.08	21.20	21.32									
ICMP 19103	<i>Ps</i> a b1			21.10	21.11	21.05									
ICMP 19104	<i>Ps</i> a b1			22.05	20.27	23.04									
ICMP 9854	<i>Ps</i> a b1			19.35	19.42	19.48									
NCPPB 3873	<i>Ps</i> a b1	20.24	19.66	19.76	21.67	22.38									
ICMP 19071	<i>Ps</i> a b2	27.12	27.12				28.14	28.66	30.59						
ICMP 19072	<i>Ps</i> a b2	23.47	25.07				27.10	27.51	28.41						
ICMP 19073	<i>Ps</i> a b2	25.75	25.65				27.44	27.26	27.29						
13093	<i>Ps</i> a b3	16.12	16.29										16.42	16.63	
CFBP 7811	<i>Ps</i> a b3	28.51	27.93										27.64	30.49	
CFBP 8025	<i>Ps</i> a b3												24.38	30.15	
CFBP 8026	<i>Ps</i> a b3	24.01	24.13										30.11	29.17	
CFBP 8031	<i>Ps</i> a b3	25.65	25.41										23.64	25.26	
CFBP 8032	<i>Ps</i> a b3												28.64	28.17	
CFBP 8054	<i>Ps</i> a b3	23.08	22.36										27.02	26.82	
CFBP 8062	<i>Ps</i> a b3												23.78	25.75	
CFBP 8064	<i>Ps</i> a b3												26.59	27.30	
CFBP 8110	<i>Ps</i> a b3												17.37	18.62	
HDW3	<i>Ps</i> a b3	16.33	18.16										27.67	27.31	
ICMP 18743	<i>Ps</i> a b3	26.23	26.78										27.01	25.54	
ICMP 19439	<i>Ps</i> a b3	26.35	26.10										18.66	17.3	
JF8	<i>Ps</i> a b3												24.34	24.4	
LSV39_26	<i>Ps</i> a b3														

LSV40_47	<i>Psa b3</i>	27,26	26,23	
CFBP 7812	<i>Psaf</i>	21.26	23.92	
CFBP 7901	<i>Psaf</i>	27.09	27.05	
CFBP 7907	<i>Psaf</i>	27.13	27.19	
CFBP 7908	<i>Psaf</i>	25.45	24.14	
CFBP 7909	<i>Psaf</i>	25.88	26.60	
CFBP 7951	<i>Psaf</i>	18.13	18.12	
CFBP 8044	<i>Psaf</i>	26.55	24.98	
CFBP 8105	<i>Psaf</i>	23.47	25.00	
CFBP 8106	<i>Psaf</i>	26.51	26.78	
CFBP 8107	<i>Psaf</i>	26.84	27.03	
CFBP 8160	<i>Psaf</i>	23.53	26.57	
CFBP 8161	<i>Psaf</i>	26.53	27.47	
CFBP 8167	<i>Psaf</i>	27.08	26.53	
LSV43_28	<i>Psaf</i>	26.13	26.39	
LSV43_40	<i>Psaf</i>	24.52	25.10	

a. Ct values obtained for each PCR Run. *Psa b1*: *Psa* biovar 1; *Psa b2*: *Psa* biovar 2; *Psa b3*: *Psa* biovar 3.

Table 5. Validation of TaqManPsa, TaqManPsab3 and TaqManPsaf on naturally infected samples.

Sample	TaqManPsa*	TaqManPsab3*	TaqManPsaf*
Wood-1	16.52	17.09	
Wood-2	14.84	15.52	
Wood-3	18.57	19.56	
Wood-4	18.09	18.51	
Wood-5	18.68	19.55	
Wood-6	18.23	19.52	
Wood-7	19.71	20.13	
Wood-8	20.28	20.53	
Wood-9	22.30	22.87	
Wood-10	19.31	19.92	
Wood-11	17.40	18.29	
Wood-12	16.98	17.73	
Leaf-1	24.30	24.69	
Leaf-2	18.89	19.48	
Leaf-3	19.75	20.60	
Leaf-4	23.12	23.63	
Leaf-5	20.09	21.01	
Leaf-6	21.77	22.44	
Leaf-7	19.51	20.15	
Leaf-8	25.74	26.11	
Leaf-9	25.25	25.83	
Leaf-10	20.40	20.95	
Leaf-11	21.40	22.08	
Leaf-12	20.23	20.98	
Leaf-13			24.38

*Ct values.

Chapitre II. Discussion générale

A la suite de la détection de *Psa* en France en 2010, des mesures ont été prises par le Ministère de l'Agriculture afin de recenser les vergers impactés par la maladie. Un plan national de surveillance a été mis en place en 2011 et tout échantillon présentant des symptômes caractéristiques du chancre bactérien du kiwi (tâches sur feuille et chancre sur bois) était adressé au LSV d'Angers pour être plus finement diagnostiqué en laboratoire. Toutes les souches de *Pseudomonas syringae* isolées de ces échantillons symptomatiques ont été mises en collection au LSV. Lorsque les travaux ont commencé, la collection incluait 280 souches.

L'objectif principal de notre travail était de mesurer la répartition et de comprendre la structuration des populations de souches de *Psa* isolées en France et dans les autres pays touchés par cette bactériose, dans le but d'améliorer la gestion de cette épidémie.

Pour répondre à cet objectif, j'ai dans un premier temps caractérisé la collection de souches isolées en France avec des tests biochimiques, pathogéniques et moléculaires, et une étude phylogénétique par MLSA m'a permis de positionner ces souches au sein de la taxonomie des *Pseudomonas syringae*. Puis dans un deuxième temps, j'ai étudié la structuration des populations isolées en France et dans d'autres pays par MLVA afin de retracer les routes d'invasion et d'identifier l'origine de l'épidémie en France. Enfin, afin de renforcer la surveillance de *Psa* et de *Psaf*, j'ai développé des nouveaux outils de détection et d'identification par PCR temps réel.

1. Une pierre apportée à l'édifice de la taxonomie des *Pseudomonas syringae*

Les bactéries pathogènes des plantes du complexe d'espèce *Pseudomonas syringae sensu lato* ont été classées au sein de 8 genomospecies (Gardan *et al.*, 1999, Bull *et al.*, 2011) ou 13 phylogroupes (Berge *et al.*, 2014). Ces classifications sont la résultante au départ d'analyses d'hybridation ADN-ADN puis d'études phylogénétiques utilisant les séquences de gènes de ménages. La comparaison de la classification taxonomique et phylogénétique montre une cohérence entre les deux méthodes d'analyse basées toutes les deux sur la composition du génome bactérien. L'approche phylogénétique montre beaucoup d'avantages sur l'hybridation ADN/ADN. Elle définit des groupes discrets et traduit les relations entre ces groupes. De plus, elle est techniquement beaucoup plus fiable et permet le partage des données qui peuvent être prises comme références pour placer un isolat à identifier.

Les pathovars ont été définis sur la base de la pathogénie des souches qu'ils regroupent selon les symptômes causés sur un hôte ou une gamme hôtes. Il se trouve que les pathovars identifiés correspondent à des lignées phylogénétiques.

1.1. Description d'un nouveau pathovar au sein des *Pseudomonas syringae* : *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum*

La caractérisation biologique, biochimique et pathogénique des 280 souches isolées en France a révélé la présence de deux biovars de *Psa*, la majorité des souches (89%) a été assimilée au biovar 3 et la minorité (11%) au biovar 4.

Pour aller plus en détail dans la caractérisation nous avons en premier lieu utilisé une méthode de rep-PCR, la BOX-PCR utilisée dans les premières études de diversité des souches de *Psa* isolées en Italie (Mazzaglia *et al.*, 2011). L'appartenance des deux groupes de souches aux biovars 3 et 4 fut confirmée par la BOX-PCR, révélant une similitude de 100% des profils *Psa* biovar 3 et 4 isolées en France avec celles précédemment isolées en Italie et Nouvelle-Zélande. Jusque-là, aucune distinction n'avait été mise en évidence au sein de souches de *Psa* biovar 4, mais notre étude révéla qu'une souche de *Psa* biovar 4 isolée en Nouvelle-Zélande se distinguait des autres par la présence de bandes supplémentaires sur son profil BOX-PCR. Les méthodes d'analyse du génome par rep-PCR et BOX-PCR permettent d'évaluer la structuration de taxons bactériens. Elles présentent cependant des contraintes et des limites qui ne permettent de tirer des conclusions que sur le groupe de souches étudiées. Nous avons

donc décidé d'utiliser la MLSA pour caractériser les diversités des souches de *P. syringae* associées aux nécroses sur kiwi. La phylogénie construite par MLSA dévoila de la diversité supplémentaire au sein de *Psa* biovar 4, qui ne contient pas seulement deux lignées, comme révélé avec la BOX-PCR, mais quatre lignées génétiques distinctes.

Compte-tenu du faible pouvoir pathogène des souches de *Psa* biovar 4 et de leur distance génétique avec le cluster qui inclue les trois autres biovars de *Psa*, nous avons proposé d'élever ces souches au rang de pathovar en les renommant *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum*. A ce jour *Psaf* a été isolé en Nouvelle-Zélande (lignées 1 et 3), en Australie (lignée 1), en France (lignées 1, 2 et 4) et très récemment en Espagne (lignée supplémentaire) (Vanneste *et al.*, 2013, Cuntly *et al.*, 2015, Abelleira *et al.*, 2015).

Nous avons ainsi pu affiner la taxonomie des *Pseudomonas syringae* et celle des agents pathogènes bactériens inféodés au kiwi. Jusqu'à ce jour les *Pseudomonas* pathogènes du kiwi incluaient *P. syringae* pv. *syringae*, *P. viridiflava* et *P. syringae* pv. *actinidiae*. Nous avons distingué *P.s syringae* pv. *actinidifoliorum* sur à la liste. Chacun de ces pathovars développe une interaction différente avec le kiwi qui mène à des maladies différentes, mais qui peuvent avoir certains symptômes partagés (taches foliaires).

1.2. Hypothèses sur l'histoire, l'origine et la répartition de *Psaf*

En France, *Psaf* a été isolé sur de vieux vergers plantés dans les années 1970 et 1980. Les premiers plants de kiwi plantés en France furent importés de Nouvelle-Zélande, puis par la suite la multiplication fut réalisée « à domicile ». En Nouvelle-Zélande, nous ne savons pas si *Psaf* a été isolé sur de vieux vergers. En Australie une souche fut isolée en 1990, soit 18 ans avant le début de l'épidémie de *Psa* biovar 3, et en Espagne, les souches ont été isolées sur des vergers plantés il y a 30 ans. La détection de *Psaf* dans les vergers de kiwi est corrélée avec l'arrivée de l'épidémie de *Psa* biovar 3. En France, des producteurs de kiwi nous ont fait part qu'ils avaient remarqué la présence de tâches nécrotiques sur feuilles dans les vergers depuis plusieurs dizaines d'années, mais les symptômes n'évoluant pas au-delà, et surtout n'impactant pas la production, aucune attention n'y avait été apporté. Tous ces éléments convergent vers une même hypothèse, qui est la suivante : *Psaf* est présent dans les vergers de kiwi depuis plus longtemps que *Psa* et sa découverte est le fruit de campagnes d'échantillonnage soutenues suite à l'arrivée d'une souche épidémique très agressive avec un impact économique important ; les deux pathovars partageant un élément de leur cycle biologique respectif : il provoque des taches nécrotiques sur feuille de kiwi. Cette hypothèse

est soutenue par l'étude MLSA conduite sur les séquences de gènes de ménages, des gènes très conservés qui évoluent lentement, qui a révélé de la diversité au sein de *Psaf* alors que *Psa* biovar 3 a une structure clonale. De même, les résultats de l'étude de généalogie clonale ont montré que l'ancêtre commun des souches de *Psaf* est plus ancien que celui des trois biovars de *Psa*.

Concernant l'origine de *Psaf* en France, deux hypothèses sont plausibles. La première serait que *Psaf* aurait été introduit en France au même moment que son hôte, lorsque les premiers plants furent importés de Nouvelle-Zélande en France dans les années 1970-1980. Pour ce qui est de l'Australie et de l'Espagne, nous ne connaissons pas l'origine des plants et il nous est impossible d'établir cette même hypothèse pour ces pays. La deuxième hypothèse serait que la gamme d'hôtes de *Psaf* serait plus large. Des travaux menés par Scortichini et collègues en 2015 (Ferrante & Scortichini, 2015) ont montré que *Psaf* pouvait induire des chancres sur *Prunus cerasus* (cerisier) et des nécroses sur fruit chez *Capsicum annuum* (poivron). Abelleira et collègues (Abelleira *et al.*, 2015) ont confirmé le pouvoir pathogène de *Psaf* sur poivron mais pas sur cerisier. Il semblerait ainsi que la gamme d'hôtes de *Psaf* ne soit pas restreint à *Actinidia*. *Psaf* pourrait être présent de façon endémique en France, en Nouvelle-Zélande, en Australie et en Espagne. De même, *Psaf* serait endémique dans chacun de ces pays et associé à d'autres plantes hôtes, puis se serait adapté à *Actinidia* lorsque les cultures ont été implantées dans ces pays, correspondant à un modèle d'émergence de saut d'hôte.

A la vue des résultats de nos travaux, et de ces informations supplémentaires, il ne nous est pas possible de confirmer ou d'infirmer une de ces deux hypothèses.

1.3. L'importance de la dénomination des bactéries en phytopathologie

L'harmonisation de la dénomination des bactéries, permettant d'obtenir une taxonomie bien définie et universelle, est primordiale dans le domaine de la phytopathologie. Différents noms ont été utilisés depuis 2010 pour qualifier les différentes souches de *Psa*, tels que haplotypes, *PsaI*, *PsaJ*, *PsaV* ou *PsaLV*. A chaque nouvel article était associée une nouvelle dénomination. A terme cela peut porter à confusion et nuire à la compréhension de l'agent pathogène étudié. Dans le manuscrit nous avons choisi d'utiliser le terme « biovar » car la caractérisation initiale des souches été basée sur des caractères phénotypiques (biochimique et biologiques). Les analyses génétiques effectuées ont ensuite montré que ces biovars correspondaient à des lignées génétiques discrètes.

La re-nomination des souches de *Psa* biovar 4 en *Psaf* a, en premier lieu, pour nous un sens au niveau biologique. Le nom *actinidifoliorum* a été appliqué en référence aux symptômes se limitant à des tâches nécrotiques sur feuilles et sur *Actinidia*. Une délimitation de ces souches au niveau du pathovar était possible car elles sont pathogènes. Le pathovar est ainsi relatif à un pouvoir pathogène sur un hôte ou une gamme d'hôte donnée. Mais la question de la légitimité du pathovar se pose pour certaines souches qui ont été décrites en fonction de l'hôte d'isolement, et qui au final présentent une gamme d'hôtes plus large. Cette question a été soulevée par Lamichhane *et al.* (Lamichhane *et al.*, 2015) pour les *Pseudomonas syringae*. Par exemple, *P. syringae* pv. *maculicola*, initialement isolé de crucifères (McCulloch, 1911), serait également un agent pathogène de la tomate (Cintas *at el.*, 2002), *P. syringae* pv. *alisalensis* initialement isolé de crucifères (Cintas *at el.*, 2002), serait également un agent pathogène de la tomate, du brome (*Bromus diandrus*) et de l'avoine (Sarris *et al.*, 2013). Concernant *Psaf*, il est possible que sa gamme d'hôte ne soit pas restreinte à un seul hôte (*Actinidia*), mais l'attribution d'un nouveau nom de pathovar était primordial pour n'inclure dans le pathovar *actinidiae* que les souches responsables de chancre pour pouvoir faire évoluer la réglementation et les méthodes de luttés (voir partie 3.1). Le fait que les souches identifiées à un pathovar, dont le nom fait référence à une plante hôte particulière malgré qu'il soit possible de montrer sa capacité à développer un symptôme sur d'autres plantes, n'enlève pas l'intérêt de définir les pathovars. Ces pathovars correspondent à des taxons dont les éléments partagent des caractéristiques communes qu'il est utile de définir pour les études de pathologie et d'écologie de ces bactéries associées aux plantes.

1.1. **Quel est le lien entre les pathovars *actinidiae* et *theae*?**

L'analyse par MLSA a révélé que les pathovars *actinidiae* et *theae* sont génétiquement proches. Le pathovar *actinidiae* est plus distant d'*actinidifoliorum* que de *theae*. *P. syringae* pv. *theae* (*Pth*) est un agent pathogène du théier, identifié en 1983 et qui est responsable de nécroses sur tige et sur feuilles (Takikawa *et al.*, 1988). Le théier, ou *Camellia sinensis*, est une plante originaire d'Asie. En Chine, le thé était initialement cultivé au sud-ouest et les cultures ont rapidement gagné le sud-est du pays en suivant le fleuve Yang-Tsé-Kiang. Les espèces sauvages sont présentes dans la zone montagneuse du sud-ouest. Le théier pousse sur des sols acides entre 1 000 et 2 000 mètres d'altitude, sous climat chaud et humide. Le kiwi, pousse spontanément en Chine dans les zones montagneuses qui longent le Yang-Tsé-Kiang et on peut le retrouver aux mêmes altitudes que le thé. Des tests de pouvoir pathogènes de

souches de *Psa* biovar 1 et de *Pth* ont été réalisés sur *Actinidia deliciosa* et *Camellia sinensis* (Scortichini *et al.*, 2002). Les résultats de ces tests ont mis en évidence que ces deux souches sont hôte-spécifique, *Psa* biovar 1 et *Pth* n'affectent pas le thé et le kiwi, respectivement. Les seules réactions visibles autour du point d'inoculation étaient la résultante d'une HR mise en place par la plante.

De par la proximité géographique de leur plante hôte et de la proximité génétique des deux pathovars, nous pouvons supposer que leur ancêtre commun est originaire de Chine. La domestication du kiwi et du thé correspond à la fois à un déplacement géographique des plantes et à un changement de compartiment environnemental, passant d'un écosystème naturel à un agro-écosystème. Ces facteurs favorisent la mise en contact de la microflore inféodée au kiwi ou au thé avec celle du nouvel environnement. A partir de là nous pouvons imaginer un scénario d'émergence plausible quant à l'émergence de clones épidémiques sur *Actinidia* ou sur *Camellia* : la spéciation d'hôte. C'est-à-dire que la domestication des cultures de thé et de kiwi serait le facteur de la divergence de *Pth* et *Psa* à partir de l'ancêtre commun. Des événements, tels que des transferts horizontaux de gènes en lien avec le pouvoir pathogène se seraient produits entre la flore inféodée aux plants de thé et de kiwi (qui au départ était dans un compartiment sauvage) et la flore du nouvel environnement où les plants ont été introduits.

Des analyses de comparaisons génomiques d'échantillons de populations bactériennes isolées de la flore sauvage de *Camellia* et d'*Actinidia*, ainsi que de parcelles cultivées de *Camellia* et d'*Actinidia*, apporteraient des éléments de réponse en faveur de la compréhension de l'histoire évolutive de ces deux agents pathogènes et des mécanismes qui ont favorisé leur émergence.

2. De nouveaux éléments sur la biologie de *Psa*

2.1. Gamme d'hôtes du pathovar *actinidiae*

Psa a été isolé sur différentes espèces d'*Actinidia* cultivées: *A. chinensis*, *A. deliciosa*, *A. kolokmita* et *A. arguta* (Serizawa *et al.*, 1989, Scortichini, 1994, Vanneste *et al.*, 2014, Ushiyama *et al.*, 1992b). Dans notre étude MLVA, nous avons inclus des souches, données par le Pr. Zhu, isolées en Chine de deux plantes (*Paulownia fortunei* et *Alternanthera philoxeroides*) qui se trouvent en bordure de vergers de kiwi et d'un insecte (*Philagra* sp.). L'isolement et la caractérisation de ces souches, réalisés en Chine, n'ont pas encore fait l'objet d'une publication scientifique. Nous ne sommes pas certains que le 4^{ème} postulat de Koch ait été vérifié. Néanmoins, nous pouvons suggérer deux hypothèses pour les plantes, en se basant sur le fait que *Psa* aurait pu être disséminé par le vent et la pluie sur les feuilles de ces plantes. La première hypothèse serait que ces plantes sont des hôtes pour *Psa*, ce qui élargirait alors le spectre d'hôte connu à ce jour au-delà du genre *Actinidia*. Cependant, les symptômes observés sur ces plantes sont des taches sur feuille, les mécanismes mis en jeu pour coloniser les vaisseaux du xylème chez *Actinidia* n'ont pas été observés dans le xylème de ces deux plantes. Ces plantes pourraient alors être qualifiées de plantes réservoir sur lesquelles *Psa* est capable de vie épiphyte et de multiplication dans le parenchyme foliaire lui permettant de se multiplier et maintenir sa densité de population. La deuxième hypothèse serait que ces plantes ne sont ni des plantes hôtes, ni des plantes réservoir. L'isolement de *Psa* aurait été la conséquence d'une vie épiphyte stricte, la superposition de deux évènements dont le premier est la dissémination de *Psa* sur les feuilles de ces plantes, et le deuxième la présence de taches nécrotiques sur les feuilles similaires à celles induites par *Psa* mais qui auraient une autre origine.

Il n'y a pas de vecteur de *Psa* connu à ce jour. Aucune information, relative à la partie de l'insecte à partir de laquelle *Psa* a été isolé, ne nous a été donnée. Sans informations complémentaires on peut considérer que : *Philagra* sp. n'a joué qu'un rôle de dissémination passive de *Psa* (l'insecte aurait pu être en contact avec de l'exsudat bactérien).

Une nouvelle prospection dans des vergers de kiwi infectés par *Psa* en Chine, ainsi que la vérification du 4^{ème} postula de Koch pour les deux plantes, permettraient de clarifier le rôle de *Paulownia fortunei*, d'*Alternanthera philoxeroides* et de *Philagra* sp. dans le cycle de vie de *Psa*.

2.2. *Psa*, une bactérie du xylème qui prend racine ?

Une des particularités de *Psa*, et que l'on retrouve chez d'autres *Pseudomonas* phytopathogènes telles que *P. avellanae* ou *P. syringae* pv. *aesculi* par exemple, est sa capacité à coloniser les vaisseaux du xylème. La colonisation de la plante hôte ne se fait pas seulement de façon épiphytique mais également de manière endophytique.

Tyson et collègues (Tyson *et al.*, 2014) ont observé la migration systémique de *Psa* sur des troncs de deux ans d'*Actinidia chinensis* 'Hort16A' greffés sur un porte-greffe d'*Actinidia deliciosa* 'Bruno'. *Psa* a été inoculé sur le tronc, au-dessus du point de greffe. Les mouvements de *Psa* observés étaient ascendants et descendants, la bactérie étant capable de coloniser les parties du tronc au-dessus et au-dessous du point d'inoculation, en-dessous du scion et jusqu'au système racinaire. En France, deux souches de *Psa* ont été isolées à partir de racines (Cunty *et al.*, 2015), soutenant les résultats du travail des néo-zélandais. Même si le mouvement de la sève dans le xylème est connu pour être ascendant, des racines vers les feuilles pour apporter les minéraux et l'eau indispensables pour la réaction de photosynthèse, il semblerait que *Psa* puisse migrer de manière descendante dans la plante grâce à des mécanismes encore non décrits.

La capacité de *Psa* à migrer vers le système racinaire est un élément important de compréhension de la biologie de cette bactérie pathogène. En été il est difficile, voire impossible, d'isoler la bactérie à partir d'échantillons symptomatiques de feuilles, *Psa* ne supportant pas des températures trop élevées. Nous pourrions supposer que lors d'épisodes de grosses chaleurs, ou de canicule, la bactérie se réfugie dans le xylème, et peut-être même dans le système racinaire. Il serait intéressant de réaliser des isollements au cours des quatre saisons afin d'évaluer l'impact du cycle biologique d'*Actinidia* sur la migration de *Psa* vers les racines. Une analyse de la localisation de la bactérie dans les tissus, en utilisant la microscopie confocale par exemple, permettrait de mieux comprendre quels sont les tissus colonisés lors de la migration descendante de la bactérie.

3. Les apports des travaux dans la lutte et la réglementation des bactéries pathogènes du kiwi

Pour appliquer des mesures efficaces de contrôle et de lutte contre un agent pathogène, il est essentiel de disposer d'informations relatives à sa taxonomie, sa biologie, sa dissémination et les facteurs favorisant sa propagation.

Les résultats de nos travaux ont apporté des éléments supplémentaires dans la compréhension de *Psa* et *Psaf* qui vont permettre de faire évoluer les méthodes de lutte et la réglementation de ces deux bactéries pathogènes.

3.1. Adaptation des méthodes de lutte au champ

Afin d'éviter la propagation de la maladie au sein d'un même verger ou entre les vergers, des mesures prophylactiques avaient été mises en place dès la détection de la maladie (désinfection des outils de tailles, enlever et brûler le matériel végétal coupé infecté). Il est important de continuer à prospecter et recenser les vergers infectés par *Psaf*. En effet, nous ne disposons pas d'informations biologiques relatives à la potentielle interaction, et ce qu'elle implique, entre les populations de *Psa* et *Psaf*. Même si dans notre étude nous n'avons pu isoler les deux types de souches sur un même verger, nous ne savons pas si la présence de *Psaf* pourrait favoriser l'installation, la multiplication et la propagation de *Psa*.

Lorsque l'état sanitaire des arbres infectés était très impacté par *Psa*, il était préconisé de couper les parties infectés, de recéper au-dessus ou au-dessous du point de greffe ou d'arracher la plante. Le cultivar *Actinidia chinensis* 'Hort16A' était très sensible à *Psa* et la plupart des vergers touchés ont été recépés ou arrachés. Un nouveau cultivar *Actinidia chinensis* 'Gold3', moins sensible, a rapidement remplacé *Actinidia chinensis* 'Hort16A' dans les vergers. Les recommandations étaient de greffer *Actinidia chinensis* 'Gold3' sur les anciens pieds d'*Actinidia chinensis* 'Hort16A' recépés. Nous avons mentionné dans nos travaux que *Psa* avait été isolé à partir de racines à deux reprises et nos résultats vont dans le même sens que les travaux de Tyson *et al.* (Tyson *et al.*, 2014). Compte-tenu de la capacité de *Psa* à migrer jusque dans le système racinaire, le porte greffe infecté peut constituer une source d'inoculum. Il est possible que d'ici quelques années les vergers sur lesquels *Actinidia chinensis* 'Gold3' a été greffé à partir d'*Actinidia chinensis* 'Hort16A' infectés recépés,

présentent des symptômes typiques de *Psa* du fait de la pression d'inoculum appliquée par les portes greffes infectés.

3.2. Evolution de la réglementation à la lumière de la description de *Psaf*

En 2012, la Commission de l'Union Européenne a ordonné la mise en place et l'application de mesures drastiques dans les vergers infectés par *Psa*. Jusqu'à ce que nous proposons de renommer *Psa* biovar 4 en *Psaf*, les mêmes mesures étaient appliquées pour des vergers infectés par *Psa* ou *Psaf*.

En renommant les souches présentant une faible agressivité, et ne causant pas de chancre sur bois, nous avons proposé que les mesures appliquées à *Psa* soient moins drastiques pour *Psaf* (ne pas recéper ou arracher les plants infectés). Notre proposition est soutenue par Abelleira *et al.* (Abelleira *et al.*, 2015). Lors de la réunion bilan annuelle sur *Psa* avec les professionnels de la filière kiwi, le LSV et la DGAL (Direction Générale de l'Alimentation), la DGAL a pris en compte les résultats de nos travaux et a initié une évolution de la réglementation au niveau national.

Nos travaux ont ainsi contribué à faire évoluer la réglementation et les méthodes de lutte à appliquer dans les vergers infectés par des *Pseudomonas syringae* pathogènes du kiwi. Ils contribuent également à mieux faire accepter les méthodes de lutte préconisées aux arboriculteurs en les éclairant sur la biologie des *P. syringae* associés au kiwi.

4. La contribution des travaux à l'amélioration de l'épidémiosurveillance

La mise en place d'un plan de surveillance est une des premières mesures appliquées lors de l'observation de l'émergence d'un nouvel agent pathogène sur un territoire. Ce plan a pour objectif de prospecter les cultures qui peuvent être impactées et pour recenser le nombre de foyers épidémiques et leur distribution géographique pour évaluer la propagation de la maladie.

Les autres objectifs de la thèse étaient, après avoir caractérisé les populations de *Psa* présentes en France, de développer de nouveaux outils contribuant à l'amélioration de l'épidémiosurveillance et de la détection du chancre bactérien du kiwi.

4.1. Un schéma MLVA adapté pour étudier la structuration des populations de *Psa* biovar 3 isolées dans le monde

Psa est un agent pathogène émergent très récent. Les biovars 1 et 2 ont été isolés dans les années 1980 et 1990, et le biovar 3 beaucoup plus récemment en 2008. La récente épidémie s'est rapidement propagée à tous les pays producteurs de kiwi et a été qualifiée de pandémie. De par l'importance des enjeux économiques, surtout en Nouvelle-Zélande et en Italie, de nombreuses équipes de chercheurs ont été mobilisées et des plans de surveillance nationaux ont été mis en place. De nombreuses souches ont ainsi pu être isolées dans différents pays à différentes années. Ces éléments font de *Psa* biovar 3 un candidat idéal pour initier des études épidémiologiques. En effet, il sera facile, avec des outils très discriminants de mettre en évidence les liens entre les populations isolées dans différents pays et à différentes dates.

Pour développer un outil permettant de retracer les routes de l'épidémie de *Psa* et d'identifier l'origine de l'épidémie de *Psa* biovar 3 et de *Psaf* en France, nous avons opté pour la MLVA. La puissance de cette méthode a déjà été démontrée sur d'autres bactéries phytopathogènes appartenant au genre *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Xylella*, *Ralstonia*, *Candidatus Liberibacter* ou *Pseudomonas* (Della Coletta-Filho *et al.*, 2001, Bui Thi Ngoc *et al.*, 2009, Girond & Manceau, 2012, N'Guessan *et al.*, 2013, Matos *et al.*, 2013, Bühlmann *et al.*, 2013, Cesbron *et al.*, 2014).

Nous souhaitons développer des VNTRs applicables aux trois biovars de *Psa* et à *Psaf*. L'analyse des séquences de deux génomes nous permis d'identifier un set de 10 VNTRs

polymorphes permettant de structurer *Psa* et *Psaf*. Dans notre étude nous nous sommes concentrés sur *Psa* biovar 3 et *Psaf*, les deux bactéries pathogènes du kiwi présentes en France.

Pour l'étude de la structuration de *Psa* biovar 3, nous avons pu ajouter un autre VNTR, ne présentant pas de variation dans la longueur des régions flanquant le motif répété, amenant notre set au nombre total de 11 VNTRs. Les indices de diversité (Indice de Simpson) de ces VNTRs sont inférieurs à 0.5, allant de 0.02 à 0.47. Deux critères rentrent en ligne de compte pour expliquer l'obtention de valeurs aussi basses. D'une part, *Psa* est une bactérie émergente récente, ce qui implique que peu d'évènements évolutifs aient eu le temps de se produire et explique la clonalité des souches (visible par MLSA) et une faible diversité (visible par MLVA). D'autre part, notre collection compte un grand nombre de souches. Le calcul de l'indice de Simpson n'est pas pondéré, et ne prend pas en compte le nombre d'individus représentant chaque haplotype. Nous avons essayé de recalculer les valeurs des indices de diversité par VNTR en réduisant le nombre de souches de chaque haplotype, sachant que l'haplotype le plus fréquent est partagé par 46.47 % des souches de notre collection de travail. Nous avons alors remarqué que les valeurs des indices de diversité étaient plus élevées pour chaque haplotype.

Le schéma MLVA a identifié 55 haplotypes sur la collection de 340 souches, qui présentait un clonalité par MLSA. Notre outil permet de révéler de la diversité au sein du biovar 3 de *Psa* isolées dans différents pays (France, Italie, Chine, Nouvelle-Zélande et Chili) nous donnant une vision globale de la structuration de ce biovar dans le monde. En rapportant le nombre d'haplotypes au nombre de souches isolées par pays, les souches isolées en Chine présentent le plus de diversité, et contrairement aux autres souches elles diffèrent en moyenne par plus de deux VNTRs. Nous n'étions pas surpris par ce résultat. En effet, la Chine, qualifiée de berceau du kiwi, serait également le berceau de *Psa*. Le clone émergent de l'épidémie de *Psa* biovar 3 serait ainsi localisé en Chine et des descendants de ce clone auraient été introduits en Europe, en Nouvelle-Zélande et au Chili (Mazzaglia *et al.*, 2012, Butler *et al.*, 2013, McCann *et al.*, 2013). Il est possible que la date de l'émergence de ce « clone fondateur » en Chine soit bien antérieure à l'année de la première détection de *Psa* biovar 3 dans le reste du monde (en 2008 en Italie). Ceci expliquerait notamment la plus grande diversité observée au sein des souches isolées en Chine par rapport à celles isolées dans le reste du monde.

La MLVA, couplée à une analyse statistique de structuration de population, a montré que les souches isolées en Italie et en France étaient génétiquement étroitement liées. Compte-tenu d'autres éléments, tels que l'année de détection de l'épidémie de *Psa* dans ces deux pays ainsi que des échanges commerciaux de matériel végétal de l'Italie vers la France intensifiés ces 10 dernières années, nous suggérons que *Psa* biovar 3 serait arrivé en France d'Italie *via* des plants contaminés. Afin de savoir si l'Italie était la source de la dissémination de *Psa* en Europe, il faudrait enrichir la collection de souches isolées en Italie et ajouter à l'analyse par MLVA des souches isolées dans les autres pays européens touchés (Espagne, Portugal, Grèce, Slovénie). Il serait intéressant de connaître l'origine des plants à partir desquels les souches ont été isolées, la localisation de la pépinière d'origine, pour remonter à la (ou aux) sources de la dispersion en Europe.

Le schéma MLVA ne permet pas de corréler la structuration des populations de *Psa* biovar 3 selon la région d'isolement en France. Nous supposons que les souches sont encore en train de se diversifier et que pour le moment leur niveau de diversité n'est pas suffisant pour que l'on puisse les distinguer en fonction de l'aire géographique d'isolement.

Dans notre étude nous avons également incorporé des souches de *Psaf*. Seuls 4 VNTRs permettaient de générer de la diversité au sein de ce biovar. Les valeurs des indices de diversité étaient plus élevées que pour *Psa* biovar 3, allant de 0.05 à 0.90. Cependant, aucune structuration évidente n'a été révélée, et les populations n'étaient pas distinguées selon les lignées génétiques des souches définies par MLSA, illustrant un problème de congruence entre le modèle phylogénétique (MLSA) et épidémiologique (MLVA). Nous soupçonnons que ceci soit dû au phénomène d'homoplasie. L'homoplasie s'explique par le fait que deux individus ont un allèle identique, mais que cette identité ne résulte pas d'un ancêtre commun mais d'une évolution convergente. Pour pallier le problème d'homoplasie, il faudrait augmenter le nombre de VNTRs polymorphes et développer de nouveaux schémas MLVA pour le suivi épidémiologique de chaque population (ou lignée) de *Psaf* identifiée par MLSA.

Nous avons développé un set de 10 VNTRs adapté pour analyser la structuration des populations du pathovar *actinidiae* et *actinidifoliorum*. Dans notre étude nous ne disposons que d'une souche de *Psa* biovar 1 et de biovar 2. Il serait intéressant d'ajouter d'autres souches de ces deux biovars afin d'en évaluer le polymorphisme et de valider ou non le schéma MLVA développé, qui est centré sur *Psa* biovar 3. Il n'est pas exclu que cela fonctionne du fait de la proximité génétique de ces biovars révélée par MLSA.

4.2. Développement d'une PCR temps réel permettant une détection spécifique de chaque biovar de *Psa* et de *Psaf*

De nombreux outils de PCR sont déjà disponibles pour l'aide au diagnostic et à l'identification de souches de *Psa*. Cependant il n'y a pas d'outil qui permette de faire la distinction, de façon spécifique, entre les trois biovars de *Psa*. C'est dans ce contexte que nous avons choisi, pour la dernière partie des travaux de thèse, de développer un nouvel outil de détection des *Pseudomonas* pathogènes du kiwi permettant de distinguer les trois biovars de *Psa* et le pathovar *actinidifoliorum*.

La PCR temps réel est une méthode qui permet de générer des résultats rapidement, d'utiliser le matériel génétique extrait directement de macérât de tissus symptomatiques en s'affranchissant d'une étape d'isolement de la bactérie, et qui est très sensible (limite de détection plus basse que les PCRs conventionnelles).

L'objectif de notre étude était de proposer plusieurs PCRs temps réel. Au total, cinq couples d'amorces, et cinq sondes spécifiques à chaque couple, ont été développés pour cibler *Psa*, *Psa* biovar 1, *Psa* biovar 2, *Psa* biovar 3 et *Psaf*. Si la PCR qui cible *Psa* donne un résultat positif, il est alors possible de poursuivre les investigations en utilisant les autres PCR spécifiques de chaque biovar. Si la PCR ciblant *Psa* donne un résultat négatif, il est possible de vérifier avec la PCR ciblant *Psaf*, si les symptômes correspondent à la présence de ce pathovar.

L'intérêt de notre outil réside dans sa forte spécificité. En effet, chaque PCR a été testée sur une collection de 416 souches de *Psa*, *Psaf*, de *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas* et *Erwinia*. Seule la PCR ciblant *Psa* biovar 2 a généré 6 positifs de manière aspécifique sur les 413 résultats négatifs attendus. Les souches pour lesquelles un signal positif a été obtenu correspondent à trois souches de *Psa* biovar 3 isolées en France en 2011 et à trois souches de *Pseudomonas syringae* isolées de kiwi par Jean-Luc Gaignard en 1985 en France. L'analyse des séquences des gènes de ménage *gyrB* et *rpoD* a permis de placer ces souches sur l'arbre phylogénétique des *Pseudomonas* et révéler leur proximité génétique avec *P. syringae* pv. *syringae*. Afin de savoir si ces six souches possèdent le même gène ciblé que les *Psa* biovar 2, il faudrait séquencer les produits PCR et les comparer.

Les limites de détection obtenues à partir d'échantillons de bois artificiellement contaminés sont satisfaisantes, de 20 à 200 CFU par réaction PCR, dans leur étude Gallelli et collègues ont évalué la limite de détection à 20 CFU par réaction PCR (Gallelli *et al.*, 2014).

Le couple d'amorces de la PCR spécifique du pathovar *actinidiae* cible le gène effecteur *hopZ3*. Cet effecteur étant présent dans chacun des trois biovars, nous supposons qu'il était

déjà présent chez l'ancêtre commun aux trois biovars. Nous savons que *Psa* est une bactérie émergente récente qui est encore en évolution. Tous les biovars de *Psa* émergent d'une même lignée génétique qui contiendrait *hopZ3*. Si un nouveau biovar apparaît, il est fort probable qu'il possède l'effecteur *hopZ3*, et donc si un échantillon donne un signal positif avec la PCR spécifique de *Psa* mais pas avec les trois PCRs spécifiques des biovars 1, 2 et 3, ce résultat pourrait indiquer la présence d'un nouveau biovar potentiellement émergent. Récemment au Japon de nouvelles souches de *Psa* ont été isolées, appelées *Psa 5* (Sawada *et al.*, 2014). Nous allons solliciter le Dr. Sawada pour obtenir une souche représentative de *Psa 5* afin de vérifier notre hypothèse.

Les outils de détection que nous avons développés n'ont pas encore fait l'objet de tous les essais nécessaires à leur validation pour être proposé comme une méthode officielle de détection. Des manipulations complémentaires vont être conduites pour préciser le seuil de détection (par PCR il faudra avoir 6 répétitions pour chaque dilution de chaque échantillon de bois contaminé artificiellement) et la répétabilité (repasser les échantillons de bois contaminés artificiellement sur au moins 3 runs PCR différents).

5. Perspectives

Ces résultats soulèvent de nouvelles questions de recherche, que ce soit pour l'agent pathogène *Psa* ou l'agent pathogène *Psaf*.

5.1. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

Nous avons pu identifier l'origine de l'épidémie de *Psa* biovar 3 en France, mais qu'en est-il pour les autres pays européens ? Notre schéma d'analyse par MLVA des populations de *Psa* biovar 3 est tout à fait utilisable pour caractériser les émergences dans d'autres pays d'Europe et d'autres continents tels que l'Amérique du Sud où une émergence de *Psa* biovar 3 a été observée. Pour affiner la MLVA, il serait judicieux de tester si le fait d'ajouter à notre set de VNTRs ceux développés par Ciarroni et collègues (Ciarroni *et al.*, 2015) permettraient d'augmenter le pouvoir discriminant de notre set initial de VNTRs, de façon à mieux comprendre la propagation des souches pathogènes dans l'environnement.

Enfin, une dernière question soulevée au début de la discussion générale concerne les liens entre les pathovars *actinidiae* et *theae*. Est-ce que l'ancêtre commun de ces deux biovars présentait une gamme d'hôte large et était présent à la fois sur *Actinidia* et sur *Camellia* ? Si oui, quels sont les facteurs qui ont favorisé l'émergence de clones épidémiques tels que *Psa* et *Pth* ? Il faudrait en premier échantillonner dans le compartiment sauvage, sur *Actinidia* et sur *Camellia*. Une phylogénie permettrait de positionner les souches isolées et si des souches sont très proches des pathovars *actinidiae* et *theae*, il faudrait séquencer le génome de ces souches afin d'initier des analyses de génomique comparative et de génétique des populations. Ceci permettrait peut-être d'identifier les événements et facteurs qui ont favorisé l'émergence des clones épidémiques de *Psa* et de *Pth*. L'identification de ces facteurs et événement permettraient peut-être la mise en place de stratégies pour éviter l'émergence de nouveaux clones épidémiques sur *Actinidia*.

Enfin, quels sont les gènes impliqués dans le pouvoir vasculaire des souches de *Psa* ? Dans une étude menée sur une souche de *Xanthomonas fuscans* pv. *fuscans* (Xff 4834-R), les auteurs ont comparé le génome de la souche Xff 4834-R aux génomes de deux bactéries pathogènes du riz *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo PXO99A), agent pathogène vasculaire qui colonise les vaisseaux du xylème, et *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc BLS256), agent pathogène non vasculaire qui ne colonise que le parenchyme, afin de mettre en évidence des fonctions en lien avec le pouvoir vasculaire des souches (Darrasse *et al.*,

2013). Une analyse OrthoMCL menée sur la partie codante du génome a permis d'identifier des groupes de CDS (Coding DNA Sequence), communs et différents pour les 3 génomes. La fonction de chaque groupe CDS a pu être identifiée (implication dans le métabolisme énergétique, les voies de régulation, le transport,...) et les groupes communs aux deux souches vasculaires *Xff* 4834-R et *Xoo* PXO99A étaient impliqués dans le transport et de fonction inconnues. Afin de répondre à notre question de recherche, il serait intéressant d'utiliser le même schéma analytique présenté dans le papier cité ci-dessus pour comparer les génomes de *Psa* et de *Psaf* avec des souches de *Pseudomonas* vasculaires, telles que *Pseudomonas avellanae* ou *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. Cette comparaison pourrait peut-être permettre d'identifier des gènes ou des fonctions en lien avec le pouvoir vasculaire des souches *Psa*.

5.2. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum*

La découverte récente du pathovar *actinidifoliorum* en Espagne (Abelleira *et al.*, 2015) ouvre la porte à de nombreuses interrogations.

Existe-t-il plus de diversité au sein de *Psaf* que celle décrite à ce jour ? En Espagne, les souches de *Psaf* sont monophylétiques. Ceci est peut-être dû au fait qu'elles ont été isolées dans le même verger. Une prospection dans d'autres vergers pourrait permettre de mettre en évidence plus de diversité.

Est-ce que *Psaf* est seulement inféodé au kiwi ou bien existe-t-il d'autres plantes hôte ou réservoir ? Afin de statuer sur cette question, il convient de prospecter à nouveau, non pas dans les vergers de kiwi, mais sur les plantes en bordure des vergers. Puis une prospection dans l'environnement en général pourra permettre de révéler si *Psaf* est seulement associé au kiwi ou si c'est une bactérie ubiquiste de l'environnement. L'outil de PCR temps réel que nous avons développé pourra être de toute utilité pour avoir une traçabilité spécifique de *Psaf* au cours de campagnes d'échantillonnage.

Bibliographie

- Abelleira A, Ares A, Aguin O, *et al.*, 2015. Detection and characterisation of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* in kiwifruit in Spain. *Journal of Applied Microbiology* **in press**.
- Abelleira A, López M, Peñalver J, *et al.*, 2012. First report of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Spain. *Mol Plant Pathol* **13**, 631-40.
- Aiello D, Ferrante P, Vitale A, Polizzi G, Scortichini M, Cirvilleri G, 2015. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from Mango in Sicily and occurrence of copper-resistant strains. *Journal of Plant Pathology*, **97**, (2), 273-82
- Alfano JR, Charkowski AO, Deng W-L, *et al.*, 2000. The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 4856-61.
- Alfano JR, Collmer A, 1997. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol* **179**, 5655-62.
- Aminov RI, 2011. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Frontiers in microbiology* **2**, (158), 1-19.
- Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P, 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution* **19**, 535-44.
- Arrebola E, Cazorla FM, Durán VE, *et al.*, 2003. Mangotoxin: a novel antimetabolite toxin produced by *Pseudomonas syringae* inhibiting ornithine/arginine biosynthesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **63**, 117-27.
- Auger J, Perez I, Fullerton R, Esterio M, 2009. First report of *Verticillium* wilt of Gold Kiwifruit, *Actinidia chinensis* cv. Hort 16A, caused by *Verticillium albo-atrum* in Chile. *Plant Disease* **93**, 553-.

- Balestra G, Renzi M, Ricci L, *et al.* History of Kiwifruit Bacterial Diseases in Italy. *Proceedings of the VII International Symposium on Kiwifruit 913, 2010a*, 457-60.
- Balestra GM, Mazzaglia A, Quattrucci A, Renzi M, Rossetti A, 2009. Current status of bacterial canker spread on kiwifruit in Italy. *Australasian Plant Disease Notes* **4**, 34-6.
- Balestra GM, Renzi M, Mazzaglia A, 2010b. First report of bacterial canker of *Actinidia deliciosa* caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Portugal. *New Disease Reports* **22**, 2044-0588.
- Balestra GM, Taratufolo MC, Vinatzer BA, Mazzaglia A, 2013. A Multiplex PCR Assay for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and differentiation of populations with different geographic origin. *Plant Disease* **97**, 472-8.
- Balogh B, Jones J, Momol M, *et al.*, 2003. Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant Disease* **87**, 949-54.
- Balter M, 2007. Seeking agriculture's ancient roots. *Science* **316**, 1830-5.
- Baltrus DA, Nishimura MT, Romanchuk A, *et al.*, 2011. Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathog* **7**, e1002132.
- Belrose I, 2015. World Kiwifruit review. In: Belrose I, ed. Pullman: Belrose, Inc.
- Bender CL, Alarcón-Chaidez F, Gross DC, 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**, 266-92.
- Berge O, Monteil CL, Bartoli C, *et al.*, 2014. A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *Plos One* **9** (9), e105547.
- Berti AD, Greve NJ, Christensen QH, Thomas MG, 2007. Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *J Bacteriol* **189**, 6312-23.
- Biondi E, Galeone A, Kuzmanović N, Ardizzi S, Lucchese C, Bertaccini A, 2013. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* detection in kiwifruit plant tissue and bleeding sap. *Annals of Applied Biology* **162**, 60-70.

- Blouin A, Pearson M, Chavan R, *et al.*, 2013. Viruses of kiwifruit (*Actinidia* species). *Journal of Plant Pathology*, 221-35.
- Bradbury J, 1986. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Guide to plant pathogenic bacteria*, 175-77.
- Bühlmann A, Dreo T, Rezzonico F, *et al.*, 2013. Phylogeography and population structure of the biologically invasive phytopathogen *Erwinia amylovora* inferred using minisatellites. *Environmental Microbiology*.
- Bui Thi Ngoc LBT, Verniere C, Jarne P, *et al.*, 2009. From local surveys to global surveillance: three high-throughput genotyping methods for epidemiological monitoring of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes. *Appl Environ Microbiol* **75**, 1173-84.
- Bull CT, Clarke CR, Cai R, Vinatzer BA, Jardini TM, Koike ST, 2011. Multilocus sequence typing of *Pseudomonas syringae sensu lato* confirms previously described genomospecies and permits rapid identification of *P. syringae* pv. *coriandricola* and *P. syringae* pv. *apii* causing bacterial leaf spot on parsley. *Phytopathology* **101**, 847-58.
- Bull CT, Koike ST, 2015. Practical benefits of knowing the enemy: modern molecular tools for diagnosing the etiology of bacterial diseases and understanding the taxonomy and diversity of plant pathogenic bacteria. *Annual review of phytopathology*. **53**, (8), 1-24.
- Bultreys A, Kaluzna M, 2010. Bacterial cankers caused by *Pseudomonas syringae* on stone fruit species with special emphasis on the pathovars *syringae* and *morsprunorum* race 1 and race 2. *Journal of Plant Pathology*, **92**, (1 Supplement), 21-33.
- Burch AY, Zeisler V, Yokota K, Schreiber L, Lindow SE, 2014. The hygroscopic biosurfactant syringafactin produced by *Pseudomonas syringae* enhances fitness on leaf surfaces during fluctuating humidity. *Environmental Microbiology* **16**, 2086-98.
- Buriani G, Hadersdorfer, J, Treutter, D, Spinelli, F, 2015. Use of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as diagnostic tool to identify *Psa* in open field. In. *II International Psa Symposium*. Bologne, Italie.
- Burrus V, Marrero J, Waldor MK, 2006. The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. *Plasmid* **55**, 173-83.

- Burrus V, Pavlovic G, Decaris B, Guédon G, 2002. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Molecular microbiology* **46**, 601-10.
- Butler M. I. SPA, Black M. A., Day R. C., Lamont I. L., Poulter R. T. M., 2013. *Pseudomonas syringae* pv. from recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker belong to different clones that originated in China. *PLoS ONE* **8**, 1-18.
- Büttner D, He SY, 2009. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant physiology* **150**, 1656-64.
- Cazorla FM, De Vicente A, Ramos C, Sundin GW, 2007. *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees, progress toward understanding and control. *Plant Disease* **91**, (1), 1-17.
- Cesbron S, Pothier J, Gironde S, Jacques M-A, Manceau C, 2014. Development of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) for *Xanthomonas arboricola* pathovars. *J Microbiol Methods* **100**, 84-90.
- Chapman JR, Taylor RK, Weir BS, *et al.*, 2012. Phylogenetic relationships among global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Phytopathology* **102**, 1034-44.
- Cheng C-H, 2014. Inheritance of resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and genetic correlations with fruit characters in a diploid *Actinidia chinensis* (kiwifruit) population. *Euphytica* **198**, 305-15.
- Chiou C, Jones A, 1993. Nucleotide sequence analysis of a transposon (Tn5393) carrying streptomycin resistance genes in *Erwinia amylovora* and other gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **175**, 732.
- Ciarroni S, Gallipoli L, Taratufolo MC, *et al.*, 2015. Development of a Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA) to unravel the intra-pathovar structure of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* populations worldwide. *PLoS ONE* **10**, e0135310.
- Cintas N, Koike S, Bull C, 2002. A new pathovar, *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* pv. nov., proposed for the causal agent of bacterial blight of broccoli and broccoli raab. *Plant Disease* **86**, 992-8.
- Clerc A, Manceau C, Nesme X, 1998. Comparison of randomly amplified polymorphic DNA with amplified fragment length polymorphism to assess genetic diversity and genetic relatedness within genospecies III of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 1180-7.

- Clover G, Pearson M, Elliott D, Tang Z, Smales T, Alexander B, 2003. Characterization of a strain of Apple stem grooving virus in *Actinidia chinensis* from China. *Plant Pathology* **52**, 371-8.
- Conn K, Gubler W, Hasey J, 1993. Bacterial blight of kiwifruit in California. *Plant Disease* **77**, 228-30.
- Constantinidou H, Hirano S, Baker L, Upper C, 1990. Atmospheric dispersal of ice nucleation-active bacteria: the role of rain. *Phytopathology* **80**, 934-7.
- Cooksey DA, 1990. Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. *Annual review of phytopathology* **28**, 201-19.
- Cornish D, Yu J, Oldham J, Bengé J, Max W, Vanneste J, 2015. In vitro inhibition of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* by wound protectants. *New Zealand Plant Protection* **68**, 332-9.
- Costa TR, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, *et al.*, 2015. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology* **13**, 343-59.
- Coutinho T, Westhuizen L, Roux J, Mcfarlane S, Venter S, 2015. Significant host jump of *Xanthomonas vasicola* from sugarcane to a *Eucalyptus grandis* clone in South Africa. *Plant Pathology* **64**, 576-81.
- Coutinho TA, Venter SN, 2009. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Mol Plant Pathol* **10**, 325-35.
- Crosse J, 1959. bacterial canker of stone-fruit: IV. Investigation of a method for measuring the inoculum potential of cherry trees. *Annals of Applied Biology* **47**, 306-17.
- Cunty A, Poliakoff F, Rivoal C, *et al.*, 2015. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*) isolated from France and assignment of *Psa* biovar 4 to a de novo pathovar: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov. *Plant Pathology* **64**, 582-96.
- Daft G, Leben C, 1972. Bacterial blight of Soybeans: epidemiology of blight outbreaks. *Phytopathology* **62**, 57-62.
- Dangl JL, Jones JD, 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-33.

- Darrasse A, Carrère S, Barbe V, *et al.*, 2013. Genome sequence of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* strain 4834-R reveals that flagellar motility is not a general feature of xanthomonads. *BMC genomics* **14**, 761.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD, 2000. Emerging infectious diseases of wildlife threats to biodiversity and human health. *Science* **287**, 443-9.
- Della Coletta-Filho H, Takita MA, De Souza AA, Aguilar-Vildoso CI, Machado MA, 2001. Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a variable number of tandem repeat analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 4091-5.
- Deng WL, Rehm AH, Charkowski AO, Rojas CM, Collmer A, 2003. *Pseudomonas syringae* Exchangeable Effector Loci: sequence diversity in representative pathovars and virulence function in *P. syringae* pv. *syringae* B728a. *J Bacteriol* **185**, 2592-602.
- Deslandes L, Rivas S, 2012. Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends in plant science* **17**, 644-55.
- Di Lallo G, Evangelisti M, Mancuso F, *et al.*, 2014. Isolation and partial characterization of bacteriophages infecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, causal agent of kiwifruit bacterial canker. *Journal of basic microbiology* **54**, 1210-21.
- Di Marco S, Calzarano F, Osti F, Mazzullo A, 2004. Pathogenicity of fungi associated with a decay of kiwifruit. *Australasian Plant Pathology* **33**, 337-42.
- Donati I, Buriani G, Cellini A, Mauri S, Costa G, Spinelli F, 2014. New insights on the bacterial canker of kiwifruit (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*). *Journal of Berry Research* **4**, 53-67.
- Dreo T, Pirc M, Ravnkar M, *et al.*, 2014. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker of Kiwifruit in Slovenia. *Plant Disease* **98**, 1578-.
- Dye D, 1980. Bradbury JF Goto M., Hayward AC, Lelliott RA, Schroth MN, 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovars names and pathotype strains. *Review of Plant pathology* **59**, 163-8.
- Elberse KE, Nunes S, Sá-Leão R, Van Der Heide HG, Schouls LM, 2011. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis for *Streptococcus pneumoniae*: comparison with PFGE and MLST. *PLoS ONE* **6**, e19668.

- Engering A, Hogerwerf L, Slingenbergh J, 2013. Pathogen–host–environment interplay and disease emergence. *Emerging Microbes & Infections* **2**, e5.
- Engst K, And Shaw, P, D, 1992. Identification of a *lysA*-like gene required for tabtoxin biosynthesis and pathogenicity in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* strain PTBR2.024. *Molecular plant-microbe interactions* **5**, 322-9.
- Eppo, 2011a. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Chile. In: Service ER, ed., 2055. (3.)
- Eppo, 2011b. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Switzerland. In: Service ER, ed., 2168. (8.)
- Eppo, 2011c. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Australia. In: Service ER, ed., 2130. (6.)
- Eppo, 2013. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Germany. In: Service ER, ed., 2013/185. (9.)
- Everett K, Pushparajah I, Vergara M, 2012. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on surfaces in the orchard. *New Zealand Plant Protection* **65**, 19-24.
- Everett KR, Taylor RK, Romberg MK, *et al.*, 2011. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing kiwifruit bacterial canker in New Zealand. *Australasian Plant Disease Notes* **6**, 67-71.
- Ferguson A, 1990. Botanical nomenclature: *Actinidia chinensis*, *Actinidia deliciosa* and *Actinidia setosa*. *Kiwifruit: science and management. Auckland, Ray Richards in association with New Zealand Society for Horticultural Science*, 36-57.
- Ferrante P, Fiorillo E, Marcelletti S, *et al.*, 2012. The importance of the main colonization and penetration sites of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and prevailing weather conditions in the development of epidemics in yellow kiwifruit, recently observed in central Italy. *Journal of Plant Pathology* **94**, 455-61.
- Ferrante P, Scortichini M, 2009. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* as causal agent of bacterial canker of yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planchon) in central Italy. *Journal of Phytopathology* **157**, 768-70.

- Ferrante P, Scortichini M, 2010. Molecular and phenotypic features of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated during recent epidemics of bacterial canker on yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in central Italy. *Plant Pathology* **59**, 954-62.
- Ferrante P, Scortichini M, 2014. Frost promotes the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa* plants. *Plant Pathology* **63**, (1), 12-9.
- Ferrante P, Scortichini M, 2015. Redefining the global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* based on pathogenic, molecular and phenotypic characteristics. *Plant Pathology* **64**, 51-62.
- Flor HH, 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of phytopathology* **9**, 275-96.
- Frampton RA, Acedo EL, Young VL, *et al.*, 2015. Genome, proteome and structure of a T7-Like bacteriophage of the Kiwifruit canker phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Viruses* **7**, 3361-79.
- Frampton RA, Taylor C, Moreno AVH, *et al.*, 2014. Identification of bacteriophages for biocontrol of the kiwifruit canker phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **80**, 2216-28.
- Fraser LG, Datson PM, Tsang GK, Manako KI, Rikkerink EH, Mcneilage MA, 2015. Characterisation, evolutionary trends and mapping of putative resistance and defence genes in *Actinidia* (kiwifruit). *Tree Genetics & Genomes* **11**, 1-15.
- Froucht J, 2014. A la découverte du kiwi de l'Adour. *Dossier de Presse Interfel*, 1-12.
- Froud K, Everett K, Tyson J, Beresford R, Cogger N, 2015. Review of the risk factors associated with kiwifruit bacterial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *New Zealand Plant Protection* **68**, 313-27.
- Gaignard J, Luisetti J, 1993. *Pseudomonas syringae*, bactérie épiphyte, glaçogène et pathogène. *Agronomie* **13**, 333-70.
- Gallelli A, L'aurora A, Loreti S, 2011. Gene sequence analysis for the molecular detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: developing diagnostic protocols. *Journal of Plant Pathology* **93**, 425-35.

- Gallelli A, Talocci S, L'aurora A, Loreti S, 2012. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, causal agent of bacterial canker of kiwifruit, from symptomless fruits and twigs, and from pollen. *Phytopathologia Mediterranea* **50**, 462-72.
- Gallelli A, Talocci S, Pilotti M, Loreti S, 2014. Real-time and qualitative PCR for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolates causing recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker. *Plant Pathology* **63**, (2), 264-76.
- Gardan L, Shafik H, Belouin S, Broch R, Grimont F, Grimont P, 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov.(ex Sutic and Dowson 1959). *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 469-78.
- Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, *et al.*, 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Micro* **3**, 733-9.
- Giraud T, Gladieux P, Gavrillets S, 2010. Linking the emergence of fungal plant diseases with ecological speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **25**, 387-95.
- Gironde S, Manceau C, 2012. Housekeeping gene sequencing and multilocus variable-number tandem-repeat analysis to identify subpopulations within *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* that correlate with host specificity. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 3266-79.
- Gonzalez M, Coque M, Herrero M, 1998. Influence of pollination systems on fruit set and fruit quality in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Annals of Applied Biology* **132**, 349-55.
- Goto M, Hikota T, Nakajima M, Takikawa Y, Tsuyumu S, 1994. Occurrence and properties of copper-resistance in plant pathogenic bacteria. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **60**, 147-53.
- Graham JH, Gottwald TR, Cubero J, Achor DS, 2004. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Mol Plant Pathol* **5**, 1-15.
- Grandison G, 1983. Root-knot nematode control on kiwifruit (*Actinidia chinensis*) by chemical bare-root dip. *Plant Disease* **67**, 899-900.
- Green RL, Warren GJ, 1985. Physical and functional repetition in a bacterial ice nucleation gene. *Nature*, **317**, 645-8.

- Green S, Studholme DJ, Laue BE, *et al.*, 2010. Comparative genome analysis provides insights into the evolution and adaptation of *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* on *Aesculus hippocastanum*. *PLoS ONE* **5**, e10224.
- Greer S, C, 2012. The costs of Psa-V to the New Zealand kiwifruit industry and the wider community. In: Report AaERU, ed. Lincoln, New Zealand, 75p.
- Guenzi E, Galli G, Grgurina I, Gross DC, Grandi G, 1998. Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster A link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 32857-63.
- Haefele DM, Lindow SE, 1987. Flagellar motility confers epiphytic fitness advantages upon *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 2528-33.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM, 1996. Real time quantitative PCR. *Genome research* **6**, 986-94.
- Hirano S, S, Upper C, D, 1992. Population dynamics of *Pseudomonas syringae* in the phyllosphere. *Am Soc Microbiol.* 21-9.
- Hirano SS, Baker LS, Upper CD, 1996. Raindrop momentum triggers growth of leaf-associated populations of *Pseudomonas syringae* on field-grown snap bean plants. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2560-6.
- Hirano SS, Upper CD, 1983. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. *Annual review of phytopathology* **21**, 243-70.
- Hirano SS, Upper CD, 1990. Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Annual review of phytopathology* **28**, 155-77.
- Hirano SS, Upper CD, 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**, 624-53.
- Holeva MC, Glynos PE, Karafla CD, 2015. First report of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Greece. *Plant Disease*. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-14-0738-PDN>
- Huang H, Ferguson AR, 2001. Review: Kiwifruit in China. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **29**, 1-14.

- Huang S, Ding J, Deng D, *et al.*, 2013. Draft genome of the kiwifruit *Actinidia chinensis*. *Nature communications*. DOI: 10.1038/ncomms3640.
- Hwang MS, Morgan RL, Sarkar SF, Wang PW, Guttman DS, 2005. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 5182-91.
- Jelenska J, Yao N, Vinatzer BA, Wright CM, Brodsky JL, Greenberg JT, 2007. A domain virulence effector of *Pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts and suppresses defenses. *Current Biology* **17**, 499-508.
- Johnson JL, 1973. Use of nucleic-acid homologies in the taxonomy of anaerobic bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* **23**, 308-15.
- Jombart T, Devillard S, Balloux F, 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genetics* **11**, 94.
- Jombart T, Pontier D, Dufour A, 2009. Genetic markers in the playground of multivariate analysis. *Heredity* **102**, 330-41.
- Jones JD, Dangl JL, 2006. The plant immune system. *Nature* **444**, 323-9.
- Kaffarnik FA, Jones AM, Rathjen JP, Peck SC, 2009. Effector proteins of the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* alter the extracellular proteome of the host plant, *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & Cellular Proteomics* **8**, 145-56.
- Keim P, Price L, Klevytska A, *et al.*, 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **182**, 2928-36.
- King EO, Ward MK, Raney DE, 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of laboratory and clinical medicine* **44**, 301-7.
- Koh Y, Cha Bj, Chung Hj, Lee Dh, 1994. Outbreak and spread of bacterial canker of kiwifruit. *Korean Journal of Plant Pathology* **10**, 68-72 (Abstract).
- Koh Y, Kim G, Lee Y, *et al.*, 2012a. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidiae* subsp. nov., a new bacterial pathogen causing canker-like symptoms in yellow kiwifruit, *Actinidia chinensis*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **40**, 269-79.

- Koh Y, Park S, Lee D, 1996. Characteristics of bacterial canker of kiwifruit occurring in Korea and its control by trunk injection. *Korean Journal of Plant Pathology* **12**, (3), 324-30.
- Koh YJ, Kim GH, Koh HS, Lee YS, Kim SC, Jung JS, 2012b. Occurrence of a New Type of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Strain of Bacterial Canker on Kiwifruit in Korea. *The Plant Pathology Journal* **28**, 423-7.
- Koh YJ, Nou IS, 2002. DNA markers for identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Molecules and cells* **13**, 309.
- Konstantinidis KT, Tiedje JM, 2005. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *J Bacteriol* **187**, 6258-64.
- Lamichhane JR, Messéan A, Morris CE, 2015. Insights into epidemiology and control of diseases of annual plants caused by the *Pseudomonas syringae* species complex. *Journal of General Plant Pathology*, 1-20.
- Lapage SP, Sneath PH, Lessel EF, Skerman V, Seeliger H, Clark W, 1992. *International code of nomenclature of bacteria: bacteriological code, 1990 revision*. ASM Press.
- Last F, 1955. Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. *Transactions of the British Mycological Society* **38**, 221-39.
- Leben C, 1965. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. *Annual review of phytopathology* **3**, 209-30.
- Lelliott R, Billing E, Hayward A, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Microbiology* **29**, 470-89.
- Lenarcic R, Morisset D, Pirc M, Llop P, Ravnikar M, Dreo T, 2014. Loop-mediated isothermal amplification of specific endoglucanase gene sequence for detection of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *PLoS ONE* **9**, (4), e96027.
- Lepoivre P, 2003. *Phytopathologie*. 1 éd. Bruxelles: De Boeck Université.
- Lepinasse J, Leterne E, 2005. *De la taille à la conduite des arbres fruitiers*. Rouergue, Portugal.
- Li J, Li X, Soejarto D, 2007a. *Actinidiaceae*. *Flora of China* **12**, 334-60.
- Li X, Li J, Soejarto DD, 2007b. New synonyms in *Actinidiaceae* from China. *Acta Phytotaxonomica Sinica* **45**, 633-60.

- Liang C-F, Ferguson GR, 1984. Emendation of the latin name of *Actinidia chinensis* PL. var. *hispidula* CF Liang. *Guihaia* **3**, 181-2.
- Liao C, Wells J, 1987. Diversity of pectolytic, fluorescent pseudomonads causing soft rots of fresh vegetables at produce markets. *Phytopathology* **77**, 673-7.
- Lin Y, Gao R, 1995. Survey and identification of *Actinidia* spp. diseases in Fujian, china. *Journal of Fujian Agricultural University* **24**, 49-53.
- Lindemann J, Upper C, 1985. Aerial dispersal of epiphytic bacteria over bean plants. *Applied and Environmental Microbiology* **50**, 1229-32.
- Lindgren PB, Peet RC, Panopoulos NJ, 1986. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "*phaseolicola*" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *J Bacteriol* **168**, 512-22.
- Lindow S, 1983. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. *Annual review of phytopathology* **21**, 363-84.
- Lindow SE, Brandl MT, 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 1875-83.
- Lindstedt BA, 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* **26**, 2567-82.
- Liu Y, Li S, Zhu T-H, Shao B, 2012. Specific DNA markers for detection of bacterial canker of kiwifruit in Sichuan, China. *African Journal of Microbiology Research* **6**, 7512-9.
- Loreti SP, F ; Stefani, E ; Abeillera, a ; Balestra, Gm ; Gaffuri, Lcf ; Giovanardi, D ; Glynos, Pe ; Gottsberger, R ; Holeva, Mc ; Karahan, a ; Karafla, Cd ; Lopez, Mm ; Mazzaglia, a ; Pucci, N ; Pilotti, M ; Taylor, Rk ; Taratufolo, Mc ; Vanneste Jl, 2015. A test performance study (TPS) on the detection and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* from wood and pollen blind samples. In. *II International Psa Symposium*. Bologne, Italie.
- Louws F, Wilson M, Campbell H, *et al.*, 2001. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Disease* **85**, 481-8.
- Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, De Bruijn F, 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2286-95.

- Luisetti J, Gaignard J, 1987. Deux maladies bactériennes du kiwi en France. *Phytoma* **391**, 42-5.
- Maayer P, Chan W, Martin D, *et al.*, 2015. Integrative conjugative elements of the ICEPan family play a potential role in *Pantoea ananatis* ecological diversification and antibiosis. *Name: Frontiers in Microbiology* **6**, 576.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, *et al.*, 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 3140-5.
- Maki LR, Galyan EL, Chang-Chien M-M, Caldwell DR, 1974. Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. *Applied microbiology* **28**, 456-9.
- Manceau C, Horvais A, 1997. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 498-505.
- Mansvelt EL, Hattingh M, 1989. Scanning electron microscopy of invasion of apple leaves and blossoms by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 533-8.
- Marcelletti S, Ferrante P, Petriccione M, Firrao G, Scortichini M, 2011. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* draft genomes comparison reveal strain-specific features involved in adaptation and virulence to *Actinidia* species. *PLoS ONE* **6**, e27297.
- Matos LA, Hilf ME, Chen J, Folimonova SY, 2013. Validation of ‘Variable Number of Tandem Repeat’-based approach for examination of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ diversity and its applications for the analysis of the pathogen populations in the areas of recent introduction. *PLoS ONE* **8**, e78994.
- Mayr E, 1942. Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist. Harvard University Press.
- Mazzaglia A, Renzi M, Balestra GM, 2011. Comparison and utilization of different PCR-based approaches for molecular typing of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains from Italy. *Canadian Journal of Plant Pathology* **33**, 8-18.

- Mazzaglia A, Studholme DJ, Taratufolo MC, *et al.*, 2012. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) isolates from recent bacterial canker of kiwifruit outbreaks belong to the same genetic lineage. *PLoS ONE* **7**, e36518.
- McCann HC, Rikkerink EH, Bertels F, *et al.*, 2013. Genomic analysis of the Kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* provides insight into the origins of an emergent plant disease. *PLoS Pathog* **9**, e1003503.
- Mccarter S, Jones J, Gitaitis R, Smitley D, 1983. Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in association with tomato seed, soil, host tissue and epiphytic weed hosts in Georgia. *Phytopathology* **73**, 1393-8.
- Mcculloch L, 1911. *A spot disease of cauliflower*. US Government Printing Office.
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY, 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**, 969-80.
- Michailides TJ, Elmer PA, 2000. Botrytis gray mold of kiwifruit caused by *Botrytis cinerea* in the United States and New Zealand. *Plant Disease* **84**, 208-23.
- Minardi PA, S; Lucchese, C; Bertaccini, A, 2015. A reliable method for *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* detection in asymptomatic kiwifruit plants three years after pathogen inoculation in micropropagated shoots and buds. In. *II International symposium on Psa*. Bologne, Italie.
- Mohr TJ, Liu H, Yan S, *et al.*, 2008. Naturally occurring nonpathogenic isolates of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* lack a type III secretion system and effector gene orthologues. *J Bacteriol* **190**, 2858-70.
- Monchiero M, Gullino ML, Pugliese M, Spadaro D, Garibaldi A, 2015. Efficacy of different chemical and biological products in the control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit. *Australasian Plant Pathology* **44**, 13-23.
- Montahut S, 2007. C'est mon histoire L'aventure du kiwi français. *Vegetable*, 2.
- Monteil CL, Cai R, Liu H, *et al.*, 2013. Nonagricultural reservoirs contribute to emergence and evolution of *Pseudomonas syringae* crop pathogens. *New Phytologist* **199**, 800-11.
- Montesinos LB, E; Cabrefiga, J; Ruz, L; Bardají, E; Planas, M; Feliu, L; Montesinos, E, 2015. Synthetic antibacterial peptides as novel compounds for the control of bacterial canker of kiwifruit. In. *II International symposium on Psa*. Bologne, Italie.

- Moore LW, 1988. *Pseudomonas syringae*: Disease and ice nucleation activity. *Ornamentals Northwest* **12**, 3.
- Morris C, Sands D, Vanneste J, *et al.*, 2010. Inferring the evolutionary history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from its biogeography in headwaters of rivers in North America, Europe, and New Zealand. *MBio* **1**, e00107-10.
- Morris CE, Monteil CL, Berge O, 2013. The life history of *Pseudomonas syringae*: linking agriculture to earth system processes. *Annual review of phytopathology* **51**, 85-104.
- Morris CE, Sands DC, Vinatzer BA, *et al.*, 2008. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *The ISME Journal* **2**, 321-34.
- N'guessan CA, Brisse S, Le Roux-Nio A-C, Poussier S, Koné D, Wicker E, 2013. Development of variable number of tandem repeats typing schemes for *Ralstonia solanacearum*, the agent of bacterial wilt, banana Moko disease and potato brown rot. *J Microbiol Methods* **92**, 366-74.
- Nakajima M, Masao G, Tadaaki H, 2002. Similarity between copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *P. syringae* pv. *tomato*. *Journal of General Plant Pathology* **68**, 68-74.
- Nakajima MY, S; Takikawa, Y; Tsuyumu, S; Hibi, T; Goto, M, 1995. Similarity of streptomycin resistance gene (s) in *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* with *strA* and *strB* of Plasmid RSF1010. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **61**, 489-92.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.*, 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research* **28**, e63-e.
- Nunney L, Yuan X, Bromley R, *et al.*, 2010. Population genomic analysis of a bacterial plant pathogen: novel insight into the origin of Pierce's disease of grapevine in the US. *PLoS ONE* **5**, e15488.
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L, 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological reviews* **198**, 249-66.
- Onorato R, Yu J, Cornish D, *et al.* Recent advances in the characterisation and control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker on kiwifruit. *Proceedings of the VII International Symposium on Kiwifruit 913, 2010*, 443-55.

- Opgenorth D, Lai M, Sorrell M, White J, 1983. *Pseudomonas* canker of kiwifruit. *Plant Disease* **67**, 1283-4.
- Palleroni N, Kunisawa R, Contopoulou R, Doudoroff M, 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **23**, 333-9.
- Pattemore D, Goodwin R, McBrydie H, Hoyte S, Vanneste J, 2014. Evidence of the role of honey bees (*Apis mellifera*) as vectors of the bacterial plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Australasian Plant Pathology* **43**, 571-5.
- Pinochet J, Verdejo S, Soler A, 1990. Observations on the seasonal fluctuation of *Meloidogyne hapla* on kiwi (*Actinidia deliciosa*) in Spain. *Nematropica* **20**, 31-7.
- Pitman AR, Jackson RW, Mansfield JW, Kaitell V, Thwaites R, Arnold DL, 2005. Exposure to host resistance mechanisms drives evolution of bacterial virulence in plants. *Current Biology* **15**, 2230-5.
- Poitras E, Houde A, 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in biology and biotechnology* **2**, 2-11.
- Pruvost O, Magne M, Boyer K, et al., 2014. A MLVA Genotyping Scheme for Global Surveillance of the Citrus Pathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri* Suggests a worldwide geographical expansion of a single genetic lineage. *PLoS ONE* **9**, e98129.
- Qian Y-Q, Yu, Dong-Ping 1991. Advances in *Actinidia* research in China. In: I.J. Warrington DHG, A.M. Snowball, D.J. Woolley, ed. *Kiwifruit II*. Palmerston North, New Zealand: Acta Horticulturae. (297.)
- Quesada JM, López MM, Penyalver R, 2012. Epidemiology and control of plant diseases caused by phytopathogenic bacteria: the case of olive knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. INTECH Open Access Publisher.
- Rees-George J, Vanneste JL, Cornish DA, et al., 2010. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S–23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions. *Plant Pathology* **59**, 453-64.
- Reglinski T, Vanneste JL, Wurms K, Gould E, Spinelli F, Rikkerink E, 2013. Using fundamental knowledge of induced resistance to develop control strategies for bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Frontiers in plant science* **4**, (24), 1-4.

- Riffaud C-H, Morris C, 2002. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in irrigation water retention basins by immunofluorescence colony-staining. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 539-45.
- Roccuzzo G, Ciancio A, Bonsignore R, 1993. Population density and soil antagonists of *Meloidogyne hapla* infecting kiwi in southern Italy. *Fundamental and Applied Nematology* **16**, 151-4.
- Rohwer F, 2003. Global phage diversity. *Cell* **113**, 141.
- Rosenzweig C, Iglesias A, Yang X, Epstein PR, Chivian E, 2001. Climate change and extreme weather events; implications for food production, plant diseases, and pests. *Global change & human health* **2**, 90-104.
- Rouse D, Nordheim E, Hirano S, Upper C, 1985. A model relating the probability of foliar disease incidence to the population frequencies of bacterial plant pathogens. *Phytopathology* **75**, 505-9.
- Rozen S, Skaletsky H, 1999. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In. *Bioinformatics methods and protocols*. Springer, 365-86.
- Ruinelli M, Bühlman, a, Schneeberger, P, Vanneste, JI, Ferrante, P, Scortichini, M, Duffy, B, Pothier, Jf, 2015. Comparative genomics informed design of a LAMP detection assay for the pandemic subpopulation of the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. In. *II International Psa Symposium*. Bologne, Italie
- Ruinen J, 1956. Occurrence of *Beijerinckia* species in the 'phyllosphere'. *Nature* **4**, (117), 220-1.
- Sands D, Schroth M, Hildebrand D, 1970. Taxonomy of phytopathogenic pseudomonads. *J Bacteriol* **101**, 9-23.
- Sarkar SF, Gordon JS, Martin GB, Guttman DS, 2006. Comparative genomics of host-specific virulence in *Pseudomonas syringae*. *Genetics* **174**, 1041-56.
- Sarkar SF, Guttman DS, 2004. Evolution of the Core Genome of *Pseudomonas syringae*, a Highly Clonal, Endemic Plant Pathogen. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 1999-2012.

- Sarris PF, Trantas EA, Baltrus DA, *et al.*, 2013. Comparative genomics of multiple strains of *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis*, a potential model pathogen of both monocots and dicots. *PLoS ONE* **8**, e59366.
- Sawada H, Miyoshi T, Ide Y, 2014. Novel MLSA group (Psa 5) of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in Japan. *Japanese Journal of Phytopathology* **80**, 171-84.
- Sawada H, Takeuchi T, Matsuda I, 1997. Comparative analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and pv. *phaseolicola* based on phaseolotoxin-resistant ornithine carbamoyltransferase gene (*argK*) and 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 282-8.
- Scortichini M, 1994. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. *Plant Pathology* **43**, 1035-8.
- Scortichini M, 2014. Field efficacy of chitosan to control *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of kiwifruit bacterial canker. *European Journal of Plant Pathology* **140**, 887-92.
- Scortichini M, Marcelletti S, Ferrante P, Petriccione M, Firrao G, 2012. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multi-faceted, pandemic pathogen. *Mol Plant Pathol* **13**, 631-40.
- Scortichini M, Marchesi U, Di Prospero P, 2002. Genetic relatedness among *Pseudomonas avellanae*, *P. syringae* pv. *theae* and *Ps* pv. *actinidiae*, and their identification. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 269-78.
- Scotto La Massese C, 1976. Nouvel hôte Européen de *Meloidogyne hapla* et *Rotylenchus robustus*: *Actinidia chinensis*. *Nematologia mediterranea* **1**, 57-9.
- Serizawa S, Ichikawa T, Takikawa Y, Tsuyumu S, Goto M, 1989. Occurrence of bacterial canker of kiwifruit in Japan: description of symptoms, isolation of the pathogen and screening of bactericides. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **55**, 427-36.
- Spinelli F, Donati I, Vanneste JL, Costa M, Costa G. 2011. Real Time Monitoring of the Interactions between *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *Actinidia* Species. In: G. Costa ARF, ed. *Proceedings of the VII International Symposium on Kiwifruit*, Faenza, Italy ISHS Acta Horticulturae 913, 461-6.

- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, *et al.*, 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**, 1043-7.
- Staley JT, 2006. The bacterial species dilemma and the genomic–phylogenetic species concept. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **361**, 1899-909.
- Staskawicz BJ, Dahlbeck D, Keen NT, 1984. Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max* (L.) Merr. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**, 6024-8.
- Stavriniades J, Mccloskey JK, Ochman H, 2009. Pea aphid as both host and vector for the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 2230-5.
- Stefani E, Giovanardi D, 2012. Dissemination of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* through pollen and its epiphytic life on leaves and fruits. *Phytopathologia Mediterranea* **50**, 489-96.
- Stewart A, Mccarrison A, 1992. Pathogenicity and relative virulence of seven *Phytophthora* species on kiwifruit. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **19**, 73-6.
- Stockwell V, Duffy B, 2012. Use of antibiotics in plant agriculture. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **31**, 199-210.
- Stukenbrock EH, Mcdonald BA, 2008. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**, 75-100.
- Sundin G, Jones A, Fulbright D, 1989. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cherry orchards and its associated transfer in vitro and in planta with a plasmid. *Phytopathology* **79**, 861-5.
- Takikawa Y, 2015. Occurrence of virulent strain of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Japan. In. *II International Psa Symposium*. Bologne, Italie.
- Takikawa Y, Ando Y, Hamaya E, Tsuyumu S, Goto M, 1988. Identification of the pathogens responsible for bacteriosis of tea plant occurred in 1983. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **54**, 224-8.

- Takikawa Y, Serizawa S, Ichikawa T, Tsuyumu S, Goto M, 1989. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: the causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **55**, 437-44.
- Taylor J, Phelps K, Dudley C, 1979. Epidemiology and strategy for the control of halo-blight of beans. *Annals of Applied Biology* **93**, 167-72.
- Thynne E, McDonald MC, Solomon PS, 2015. Phytopathogen emergence in the genomics era. *Trends in plant science* **20**, 246-55.
- Tyson J, Curtis C, Manning M, Rees-George J, Snelgar W, Blattmann P, 2014. Systemic movement of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit vines in New Zealand. *New Zealand Plant Protection* **67**, 41-7.
- Tyson J, Rees-George J, Curtis C, Manning M, Fullerton R, 2012. Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on the orchard floor over winter. *New Zealand Plant Protection* **65**, 25-8.
- Ushiyama K, Kita N, Suyama K, Aono N, Ogawa J, Fujii H, 1992a. Bacterial canker disease of wild *Actinidia* plants as the infection source of outbreak of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **58**, 426-30 (Abstract).
- Ushiyama K, Suyama K, Kita N, Aono N, Fujii H, 1992b. Isolation of kiwifruit canker pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, from leaf spot of tara vine (*Actinidia arguta* Planch.). *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **58**, 476-9 (Abstract).
- Vanneste J, 2013. Recent progress on detecting, understanding and controlling *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a short review. *New Zealand Plant Protection* **66**, 170-7.
- Vanneste JL, Yu J, Cornish DA, 2010. Molecular characterisations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains isolated from the recent outbreak of bacterial canker on kiwifruit in Italy. *New Zealand Plant Protection* **63**, 7-14.
- Vanneste J, Giovanardi D, Yu J, *et al.*, 2011a. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit pollen samples. *New Zealand Plant Protection* **64**, 246-51.
- Vanneste J, Poliakoff F, Audusseau C, *et al.*, 2011b. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit in France. *Advances in Agronomy* **235**, 295.

- Vanneste J, Yu J, Cornish D, Max S, Clark G, 2011c. Presence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit, on symptomatic and asymptomatic tissues of kiwifruit. *New Zealand Plant Protection* **64**, 241-5.
- Vanneste JL, Yu J, Cornish DA, *et al.*, 2013. Identification, virulence, and distribution of two biovars of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in New Zealand. *Plant Disease* **97**, 708-19.
- Vanneste J, Cornish D, Yu J, Stokes C, 2014. First Report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* the causal agent of bacterial canker of Kiwifruit on *Actinidia arguta* vines in New Zealand. *Plant Disease* **98**, 418-.
- Vernière C, Bui Thi Ngoc L, Jarne P, *et al.*, 2014. Highly polymorphic markers reveal the establishment of an invasive lineage of the citrus bacterial pathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri* in its area of origin. *Environmental Microbiology* **16**, 2226-37.
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski R, 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic acids research* **19**, 6823-31.
- Vogler AJ, Keys C, Nemoto Y, Colman RE, Jay Z, Keim P, 2006. Effect of repeat copy number on variable-number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157: H7. *J Bacteriol* **188**, 4253-63.
- Wang C, Ai J, Fan MS, *et al.*, 2015. *Fusarium acuminatum*: a new pathogen causing postharvest rot on stored Kiwifruit in China. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-01-15-0021-PDN>
- Wang K, Kang L, Anand A, Lazarovits G, Mysore KS, 2007. Monitoring in planta bacterial infection at both cellular and whole-plant levels using the green fluorescent protein variant GFPuv. *New Phytol* **174**, 212-23.
- Wang Z, Tang X, Liu S, 1992. Identification of the pathogenic bacterium for bacterial canker on *Actinidia* in Sichuan. *J. Southwest Agricultural University, unpaginated*. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-XNND199206007.htm.
- Wayne L, G, Brenner D, J., Colwell R, R., *et al.*, 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 463-4.
- Wilkie JP, Dye D, Watson D, 1973. Further hosts of *Pseudomonas viridiflava*. *New Zealand journal of agricultural research* **16**, 315-23.

- Woese CR, 1987. Bacterial evolution. *Microbiological reviews* **51**, 221.
- Woolhouse ME, Haydon DT, Antia R, 2005. Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 238-44.
- Xin X-F, He SY, 2013. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annual review of phytopathology* **51**, 473-98.
- Young JM, 2010. Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology* **92**, S1.5-S1.14.
- Zaluga J, Stragier P, Van Vaerenbergh J, Maes M, De Vos P., 2013. Multilocus Variable number of tandem repeats Analysis (MLVA) distinguishes a clonal complex of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains isolated from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Belgium. *BMC Microbiol*, **13**: 126.
- Zasloff M, 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-95.
- Zhao S, Poulin L, Rodriguez-R LM, Forero Serna N, Liu S-Y, Wonni I, et al., 2012. Development of a variable number of tandem repeats typing scheme for the bacterial rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Phytopathology*; 102: 948–956.
- Zhou K, Aertsens A, Michiels CW, 2014. The role of variable DNA tandem repeats in bacterial adaptation. *FEMS microbiology reviews* **38**, 119-41.

Annexe

Annexe 1 Tableau représentatif des caractéristiques biochimiques de *Psa* telles que défini par Takikawa *et al.* en 1989.

Characteristic	Kiwifruit strains	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>		<i>P. syringae</i>	
			Group C	Group B	pv. <i>syringae</i> ^{a)}	pv. <i>morsprunorum</i> ^{b)}
Fluorescent pigment						
on King's medium B	—	+	—	+	+	—
in Uchinsky's solution	—	+	—	+		
Gelatin liquefaction	— ^{b)}	+ ^{c)}	—	—	+	—
Hydrolysis of						
Esculin	—	+	—	—	+	—
Arbutin	—	+	—	—	+	—
Casein	+	+ ^{d)}	—	—	+	—
Tween 80	+	+	—	+		
Tyrosinase	—	—	+	+	—	+
Urease	—	+	—	+		
Purple milk reaction	Kw	KD	Kw	K		
Maximum NaCl tolerance	3% ^{d)}	4%	1%	3%	5%	3~5%
Maximum growth temperature	30 C	>35 C	32 C	32 C		
Growth in sucrose broth	white	yellow	white	white	yellow	white
Longevity on NSA (days)	>8	>8	<3	6~8	8~14	2~6
Utilization of						
D-Xylose	— ^{e)}	+	— ^{e)}	+		
L-Arabinose	(+) ^{f)}	+	—	+	+	+
D-Ribose	+ ^{f)}	+	—	—		
Raffinose	+	+ ^{g)}	+ ^{g)}	—		
Inositol	+	+	—	+		
Erythritol	—	+	—	+		
DL-Tartrate	—	—	+	—	—	+
DL-Lactate	—	+	—	—	+	—
Malonate	+	+	—	+		
Acetate	(+)	+	+	+ ^{h)}		
<i>n</i> -Caprate	—	+	—	+		
Glutarate	(+) ⁱ⁾	+	— ⁱ⁾	+		
Saccharate	+	+	(+)	+		
L-Histidine	—	+	— ⁱ⁾	+	+	+
L-Serine	(+)	+	—	+	+	+
L-Arginine	+	+	(+)	+	+	+
Betaine	+	+	—	—		
Trigonelline	—	+	—	—		
L-Leucine	(+)	+	— ⁱ⁾	+	+	—
L-Tyrosine	+	—	(+)	+	—	+

+: positive; —: negative; (+): delayed positive after 2 to 3 weeks; K: alkaline reaction; D: digestion; w: weak reaction.

a) Data from Garrett *et al.* (1966).

b) Kiwifruit strains showed delayed and weak liquefaction after 3 to 6 weeks.

c) Strain W 7837 negative.

d) Strain Kw 21 could grow in 2% but not in 3% NaCl.

e) Acid production was observed without any visible growth.

f) Strain Kw 22 negative.

g) Strains W 7844 and U 7805 negative.

h) Strain W 8107 negative.

i) Strain U 7805 positive.

Thèse de Doctorat

Amandine CUNTY

Caractérisation de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* l'agent responsable de l'émergence d'une épidémie de chancre bactérien du kiwi en France et description de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum*, agent causal de taches foliaires sur kiwi.

Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* the causal agent of a kiwifruit bacterial canker epidemic in France and description of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* the causal agent of leaf spots on kiwifruit.

Résumé

La bactérie responsable de chancre sur bois, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*), a causé trois épidémies depuis les années 1980 et se décline en trois biovars. La plus récente et dévastatrice (causée par *Psa* biovar 3), a été détectée pour la première fois en 2008 en Italie et s'est rapidement répandue dans la majorité des pays producteurs de kiwi, dont en France en 2010. Nous avons analysé la diversité de 280 souches de *P. syringae* isolées de kiwi en France. La caractérisation biologique et l'analyse phylogénétique des souches par MLSA ont révélé que les biovars 1, 2 et 3 appartenaient à une même lignée génétique, groupant également *P. s.* pv. *theae*. Les souches de biovar 4 constituent un ensemble de 4 lignées génétiques distinctes qui ont été rassemblées au sein d'un nouveau pathovar (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* (*Psaf*)). Ces souches sont caractérisées par une pathogénie réduite (taches foliaires mais pas de chancre). Cette nouvelle classification permet une meilleure gestion des épidémies de chancre bactérien du kiwi. Le développement d'un schéma MLVA composé de 11 VNTRs a permis d'étudier la structuration génétique de populations de *Psa* biovar 3, de révéler de la diversité au sein de ce pathovar et d'identifier l'origine italienne de l'épidémie en France. Le séquençage du génome de cinq souches de *Psaf* et la comparaison de ces séquences avec celles d'autres génomes de *Psa* et *Psaf*, disponibles sur NCBI, a permis le développement d'un nouvel outil de détection par PCR temps réel, plus spécifique de chaque biovar de *Psa* et de *Psaf*. La MLVA et la PCR temps réel développées ici contribueront à l'amélioration de la surveillance de *Psa* dans le monde.

Mots clés

Actinidia, pathovar, *actinidifoliorum*, MLSA, MLVA, DAPC, PCR temps réel, Taqman.

Abstract

The causal agent of bacterial canker, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*), has been responsible of three epidemics since 1980's. *Psa* is divided in three biovars. The most recent and severe outbreaks (caused by *Psa* biovar 3) was detected for the first time in Italy in 2008. It has spread very quickly in the main kiwifruit producing countries, as in France in 2010. We analyzed the diversity of 280 strains of *P. syringae* isolated from kiwifruit in France. The biological characterization and the phylogenetic analysis of the strains by MLSA revealed that the biovars 1, 2 and 3 belong to the same genetic lineage, which include *P. s.* pv. *theae*, as well. The biovar 4 strains, which are structured in 4 distinct genetic lineages, have been grouped in a new pathovar (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* (*Psaf*)). These strains are characterized by a low virulence (only spots on leaves and no canker on wood). This new classification help with the management of the bacterial kiwifruit canker outbreaks. The development of an MLVA scheme composed of 11 VNTRs allowed to study the genetic structuration of *Psa* biovar 3 populations, to reveal the diversity within this pathovar and to identify the Italian origin of the epidemic in France. The genome sequencing of five *Psaf* strains and the comparison between these sequences and those of *Psa* and *Psaf* genomes already available on NCBI, allowed the development of a new detection tool by real-time PCR, specific of each *Psa* biovar and of *Psaf*. The MLVA and the real-time PCR based detection technique developed here will contribute to the improvement of the monitoring of kiwifruit bacterial canker around the world.

Key Words

Actinidia, pathovar, *actinidifoliorum*, MLSA, MLVA, DAPC, real-time PCR, Taqman.