

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 6

Spécialité

Phytopathologie

présentée par **Silvia Restrepo**

pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS 6

Sujet de la thèse:

Etude de la structure des populations de *Xanthomonas axonopodis*
pv. *manihotis* en Colombie.

soutenue le 21 juin 1999

devant le jury composé de:

Mme M. BOCCARA

Président

M. C. BRAGARD

Rapporteur

M. A. TRIGALET

Rapporteur

Mme C. NEEMA

Examineur

Mme V. VERDIER

Examineur

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Martine Boccara, président de mon jury et directeur de thèse, pour son soutien tout au long de ce travail et également pour son aide lors des diverses formalités académiques et administratives.

J'exprime ma sincère reconnaissance à M. C. Bragard et à M. A. Trigalet pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon jury. Je remercie Mme C. Neema qui a accepté d'être membre du jury.

Je tiens à remercier vivement Valérie Verdier qui m'a encadré et m'a permis de réaliser mon travail dans les meilleures conditions. Je la remercie pour m'avoir constamment soutenue, pour sa disponibilité et les nombreux enseignements et expérience dont elle m'a fait bénéficier.

Je remercie M. P. Cayre, messieurs A. Poulet et J. C. Prot (département RED, ressources, environnement, développement) de l'Institut de recherche pour le développement (IRD) qui m'ont octroyé une allocation de recherche IRD pendant la durée de ces recherches.

J'exprime ma reconnaissance à M. W. Roca et J. Tohme (CIAT) pour leur accueil dans l'unité de Biotechnologie du CIAT et leur soutien tout au long de ce travail. Je tiens également à remercier M. Bonierbale, Fernando Correa-Victoria et M. Lévy pour leur conseils lors de l'analyse des résultats et leur aide lors de la préparation des publications. Merci également à Elizabeth de Paéz qui a corrigé et édité nos articles.

Un très grand merci à Myriam Cristina Duque pour son aide précieuse lors du traitement statistique des résultats et surtout pour son amitié.

Lorsque j'ai rejoint l'équipe de biotechnologie, Pedro Rocha et Gerardo Gallego ont suivi mon travail avec beaucoup d'intérêt et m'ont donné de nombreux conseils. Je les remercie vivement.

Je voudrais exprimer mes sentiments d'amitié et ma sympathie à toutes les personnes de l'équipe "bactériose", Gloria, Véronique, Claudia, Sandra, Gilly, Carolina, Paola, Monica, Jairo, Armando. J'exprime aussi mes sentiments d'amitié à Sandra, Camilo, Maria Cristina, Eliana,

Carolina. Je remercie Karol pour son aide précieuse dans la dactylographie du document et plus particulièrement pour la saisie de la bibliographie.

Je remercie Elizabeth Alvarez et l'équipe de pathologie manioc pour leur accueil dans le laboratoire de pathologie.

J'exprime également ma reconnaissance à Carlos Iglesias et à toute son équipe Fernando Calle, Jorge Ivan Lenis, Jairo Bedoya, Wilson Gaitan, Gustavo Jaramillo, Nelson Morante pour leur active collaboration dans la mise en place des essais au champ et pour les nombreuses discussions que nous avons eu sur le manioc, la sélection et l'amélioration.

Je remercie les agriculteurs qui ont bien voulu nous recevoir lors des prospections et qui ont partagé très cordialement leurs connaissances de la culture du manioc et de la maladie avec nous.

Enfin, je voudrais adresser un très grand merci à mon Père, ma Mère, Maria, Edro, Flor et Maria Ximena.

RESUME

L'un des principaux facteurs limitants de la production du manioc est la bactériose vasculaire. L'agent causal, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) provoque une grande variété de symptômes et, en cas d'attaque grave, la mort de la plante. Les objectifs de cette étude sont: (1) caractériser la structure des populations de *Xam*, (2) caractériser les pathotypes de *Xam* et proposer une gamme d'hôte différentielle, (3) étudier la dynamique des populations de *Xam*.

L'analyse RFLP a permis de mettre en évidence une différenciation géographique de *Xam* en Colombie et l'identification d'haplotypes spécifiques de chaque écozone (ECZ). Nous avons choisi un nombre limité de souche pour la caractérisation des pathotypes. La technique AFLP permet l'étude des relations phénétiques entre individus et différencie les souches au sein de population clonale. La variabilité génétique est corrélée à l'origine géographique des souches. Une interaction spécifique a été mise en évidence entre *Xam* et cultivars de manioc permettant la caractérisation des pathotypes de *Xam*. Une gamme d'hôte différentielle est proposée pour chaque écozone. Cette gamme d'hôte est évaluée en champ, dans deux écozones. L'effet de l'hôte sur la variabilité de l'agent pathogène est étudiée. Une corrélation élevée existe entre la diversité de l'hôte et celle de l'agent pathogène. L'ensemble des travaux permet de comprendre la structure des populations de *Xam* et d'orienter les stratégies de lutte et d'amélioration pour la résistance.

Mots clés: AFLP, bactériose vasculaire du manioc, haplotype, manioc, pathotype, PCR, RFLP, variabilité génétique, structure des populations, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*.

ABSTRACT

Cassava bacterial blight (CBB) is a widespread and destructive disease that can cause important yield losses. The causal agent is *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*), which can induce a wide variety of symptoms. The objectives of the present study are (1) to characterize the pathogen population structure (2) to characterize *Xam* and develop a set of host differential (3) to study the dynamics of *Xam* population.

By using a RFLP analysis, differentiation of strains at the geographical level (ECZ) was shown. We select a set of strains that were used to characterize *Xam* pathotypes on a selected set of cultivars. The AFLP technique permitted to establish phenetic relations among strains and to differentiate strains within homogeneous populations. DNA polymorphism is correlated with the geographical origin of the strains. A cultivar x strain interaction was established and different pathotypes were defined in each ecozone. A set of host differential was also proposed for each ecological zone. The level of resistance in the same set of cultivars was assessed under field conditions. The role of the host in causing differentiation of the pathogen was also shown. Collectively, the results gave an insight into the Colombian pathogen's population structure. The informations developed here, will be useful for evaluating germplasm and for developing new breeding strategies.

Key words: AFLP, cassava, cassava bacterial blight, genetic variability haplotype, pathotype, PCR, population structure RFLP, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*.

ABREVIATIONS

ADN :Acide désoxyribonucléique

AFLP: polymorphisme des longueurs de fragments amplifiés (Amplified Fragment Length Polymorphism)

AUDPC: surface sous la courbe de réponse de la plante (Area Under the Disease Progress Curve)

avr : gène d'avirulence (avirulence gene).

CBB: Bactériose vasculaire du manioc (Cassava Bacterial Blight).

CIAT: Centre International d'Agriculture Tropicale (Cali, Colombie)

EPS: ExoPolySaccharide.

ERIC : élément répété intergénique d'entérobactérie (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus)

ECZ:écozone ou zone édaphoclimatique.

GIS: Systèmes d'information géographique (Geographical Information Systems)

LPS: Lipopolysaccharide.

PCR: Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)

pth: gène de pathogénicité (pathogenicity gene)

RAPD: amplification aléatoire de l'ADN (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

REP: élément palindromique extragénique répété (Repetitive Extragenic Palindromic element)

RFLP: polymorphisme des fragments de restriction (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Xam :*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

TABLE DES MATIERES

1	INTRODUCTION	10
1.1	<u>LE MANIOC, GENERALITES</u>	10
1.1.1	Position taxonomique et caractéristiques botaniques.....	10
1.1.2	Origine et distribution	10
1.1.3	Importance économique du manioc.....	11
1.1.4	Collection, programme d'amélioration, génétique du manioc.....	12
1.1.4.1	Collections <i>ex situ</i>	12
1.1.4.2	Programme d'amélioration.....	13
1.1.4.3	Génétique.....	14
1.1.5	Maladies du manioc.....	14
1.2	<u>LA BACTERIOSE VASCULAIRE DU MANIOC</u>	15
1.2.1	Distribution géographique.....	15
1.2.2	Symptômes	16
1.2.2.1	Symptômes foliaires.....	16
1.2.2.2	Symptômes sur tiges.....	16
1.2.3	Cycle de la maladie et épidémiologie	17
1.2.3.1	Cycle de la maladie	17
1.2.3.1.1	Développement épiphyte.....	17
1.2.3.1.2	Développement systémique.....	17
1.2.3.1.3	Conservation de la bactérie.....	17
1.2.3.2	Epidémiologie	17
1.2.4	Pertes	18
1.2.5	Méthodes de lutte	18
1.3	<u>XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. MANIHOTIS</u>	20
1.3.1	Position taxonomique.....	20
1.3.2	Caractéristiques physiologiques.....	21
1.3.3	Infection de la plante par <i>Xanthomonas</i>	21
1.3.3.1	Déterminants du pouvoir pathogène.....	21
1.3.3.1.1	Gènes <i>hrp</i>	21
1.3.3.1.2	Gènes <i>avr</i>	22
1.3.3.1.3	Autres facteurs affectant le pouvoir pathogène.....	23
1.3.3.2	L'interaction <i>Xam</i> / manioc.....	23
1.3.3.3	Rôle des EPS et LPS.....	24
1.3.3.4	Gène <i>avrBs3</i> homologue chez <i>Xam</i>	24
1.3.3.5	Réactions de défense.....	25
1.3.4	Etude de la variabilité de <i>Xam</i>	25
1.3.4.1	Modèle d'étude expérimental.....	25
1.3.4.2	Variabilité du pouvoir pathogène.....	26
1.3.4.3	Caractérisation physiologique et sérologique.....	27
1.3.4.4	Variabilité génétique.....	27

1.4	<u>STRUCTURE DES POPULATIONS D'AGENTS PHYTOPATHOGENES</u>	28
1.4.1	Facteurs affectant les populations des agents pathogènes.....	29
1.4.1.1	Sélection exercée par l'hôte.....	29
1.4.1.2	Migration et flux de gènes.....	30
1.4.1.3	Recombinaison génétique.....	30
1.4.2	Caractérisation de la variabilité des populations d'agent pathogène.....	31
1.4.2.1	Etude du pouvoir pathogène.....	31
1.4.2.2	Caractérisation moléculaire.....	33
1.4.2.2.1	Analyse du polymorphisme des fragments de restriction (RFLP).....	34
1.4.2.2.2	La technique PCR.....	34
1.4.3	Indices de diversité et études phénétiques.....	36
1.4.3.1	Echantillonnage.....	36
1.4.3.2	Analyse de diversité.....	36
1.4.3.2.1	Les indices de diversité.....	37
1.4.3.2.2	Différenciation de la diversité.....	38
1.4.3.3	Analyses phénétiques.....	40
1.4.4	Analyse de la structure des populations et résistance variétale.....	42
1.5	<u>COMPOSITION DU MEMOIRE ET OBJECTIFS</u>	43
2	<u>DIVERSITE GENETIQUE DE <i>XANTHOMONAS AXONOPODIS</i> PV. <i>MANIHOTIS</i></u>	45
2.1	<u>INTRODUCTION</u>	45
2.2	<u>DIFFERENCIATION GEOGRAPHIQUE DES POPULATIONS DE <i>XANTHOMONAS AXONOPODIS</i> PV. <i>MANIHOTIS</i> EN COLOMBIE</u>	46
2.3	<u>AFLP: UNE TECHNIQUE EFFICACE POUR LA DETECTION DE LA DIVERSITE GENETIQUE DE <i>XANTHOMONAS AXONOPODIS</i> PV. <i>MANIHOTIS</i></u>	47
2.4	<u>CONCLUSION</u>	48
3	<u>VARIABILITE DU POUVOIR PATHOGENE DE <i>XANTHOMONAS AXONOPODIS</i> PV. <i>MANIHOTIS</i></u>	50
3.1	<u>INTRODUCTION</u>	50
3.2	<u>SÉLECTION DE LA GAMME D'HOTE DIFFERENTIELLE</u>	52
3.3	<u>CARACTÉRISATION DES PATHOTYPES DE <i>XANTHOMONAS AXONOPODIS</i> PV. <i>MANIHOTIS</i> EN COLOMBIE</u>	53
3.4	<u>EVALUATION DE LA GAMME D'HOTE DIFFERENTIELLE EN CHAMP</u>	74
3.5	<u>ETUDE DU POUVOIR PATHOGENE DES SOUCHES DE L'ECZ5 CARACTÉRISÉES PAR AFLP</u> ..	95
3.5.1	Matériels et méthodes.....	95
3.5.2	Résultats.....	95
3.5.3	Conclusion.....	96
3.6	<u>CONCLUSION</u>	97

4	ANALYSE MICROGEOGRAPHIQUE DE LA DIVERSITE DE <i>XANTHOMONAS</i> <i>AXONOPODIS</i> PV. <i>MANIHOTIS</i>	100
4.1	<u>INTRODUCTION</u>	100
4.2	<u>ETUDE DE LA DIVERSITE GENETIQUE DE <i>XANTHOMONAS</i> <i>AXONOPODIS</i> PV. <i>MANIHOTIS</i> À L'INTERIEUR DE DIFFERENTS CHAMPS EN COLOMBIE</u>	102
4.3	<u>CONCLUSION</u>	127
5	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	129
6	REFERENCES	135
7	ANNEXES	151

1 INTRODUCTION

1 INTRODUCTION

1.1 Le manioc, généralités

1.1.1 Position taxonomique et caractéristiques botaniques

Le genre *Manihot* appartient à la famille des Euphorbiaceae et comprend deux sections: Arboreae et Fructicoseae, représentées respectivement par des arbres et arbustes adaptés aux zones de savanes arides (104). Le manioc cultivé, *Manihot esculenta* Crantz est un arbuste pérenne dont la taille peut atteindre de 3 à 5 mètres (Figure 1A). Pendant les premiers mois de la croissance, des racines fibreuses se développent et environ 3 mois après la plantation, elles commencent à grossir et à accumuler de grandes quantités d'amidon dans le parenchyme (Figure 1B). Le nombre et la taille des racines varient. Le poids sec des racines est composé de 90% de carbohydrates, principalement de l'amidon. Les tiges ont un aspect noueux du fait de la présence de cicatrices foliaires proéminentes. Les feuilles sont simples et alternes et le fruit est une capsule déhiscente à trois loges contenant chacune une graine (51, 70).

Le manioc est multiplié principalement par voie végétative (boutures) (Figure 1C) et la plantation a lieu en général en saison pluvieuse; la récolte a lieu de 8 à 36 mois après. Dans les systèmes traditionnels, le manioc est souvent rencontré en culture associée (maïs, arachide, niébé, igname, etc).

1.1.2 Origine et distribution

Les ustensiles précolombiens utilisés pour la transformation du manioc et trouvés en Colombie et Venezuela montrent que le manioc était cultivé il y a environ 3000 à 7000 ans (189). Cependant l'origine et l'évolution de cette culture est difficile à retracer. Des études menées par Renvoize en 1973, montrent que le manioc peut avoir plusieurs origines (190). Spath (210) propose également 4 zones d'origine pour le manioc: 1) le Guatemala et le Mexique, 2) les savannes côtières du nord-ouest américain, 3) l'est de la Bolivie et le nord-ouest de l'Argentine et 4) l'est du Brésil. Les centres de diversité d'une culture ne correspondent pas nécessairement aux centres d'origine (95).

Basés sur des prospections réalisées de l'Argentine jusqu'au sud des Etats-Unis, Rogers et Appan (196) ont défini 98 espèces pour le genre *Manihot*. Elles sont distribuées le long des tropiques de basse altitude et humides d'Amérique. Nassar (159) propose 4 centres de diversité

pour les espèces sauvages: le centre du Brésil (le sud du département de Goiás et l'ouest du département de Minas Gerais) avec 38 espèces, l'ouest du Mexique (19 espèces), et deux autres centres de moindre importance, d'une part le nord-est du Brésil et l'ouest du Mato Grosso et d'autre part l'est de la Bolivie (Figure 2). Certains auteurs pensent que le manioc a été domestiqué à la suite de l'hybridation de deux espèces sauvages proches (3, 4, 196). A partir d'une étude sur la variabilité de l'ADN chloroplastique, ribosomique et nucléaire de manioc sauvages et cultivés, Fregene *et al.* (79) émettent l'hypothèse selon laquelle le manioc cultivé résulterait de la domestication d'une espèce sauvage *M. esculenta* subsp. *flabellifolia*. Ce résultat a été confirmé par Roa *et al.* (192). Par ailleurs, les variétés dites "amères" à haut contenu en acide cyanhydrique et les variétés dites "douces" à faible contenu en acide cyanhydrique dans les racines, sont distribuées dans différentes régions d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud, suggérant qu'elles aient pu être domestiquées à différents moments.

L'introduction du manioc en Afrique a été réalisée au milieu du 16^{ème} siècle par les Portugais à partir du Brésil (108). Actuellement, le manioc est largement distribué en Afrique. Il est cultivé surtout dans les zones humides, le long de la côte d'Afrique de l'ouest, à l'ouest du Zaïre, sur la côte orientale de la Tanzanie, du Mozambique et dans la région des grands lacs. En Asie, le manioc a été introduit au 18^{ème} siècle par les espagnols venant du Mexique. La culture s'est ensuite répandue rapidement à partir des Philippines, sur tout le continent Asiatique et dans l'Océan Indien (26).

Actuellement, le manioc est cultivé dans la zone tropicale comprise entre 30° de latitude nord et 30° de latitude sud, depuis le niveau de la mer jusqu'à une altitude de 2300 mètres. La plante présente une grande adaptation à des conditions écologiques très variées, ce qui explique la vaste distribution géographique de cette culture dans le monde. Son utilisation comme aliment de base pour des populations à faible revenu économique, a largement favorisé la culture du manioc dans les régions tropicales et également dans des régions où les conditions écologiques sont très sévères (zones arides) et souvent peu favorables à d'autres cultures.

1.1.3 Importance économique du manioc

Les données statistiques sur la production ne sont pas très précises, étant donné que dans la majorité des pays, le manioc reste essentiellement une culture pratiquée à petite échelle. Dix-sept millions d'hectares de manioc sont cultivés dans le monde dont 10 millions d'ha en Afrique, 2.5 millions d'ha en Amérique du Sud et 4 millions d'ha en Asie (Tableau 1). La production

mondiale atteint les 170 millions de tonnes / an; 50 % sont produites en Afrique, 30% en Asie et environ 20% en Amérique Latine. En Colombie, cette culture représente une superficie d'environ 196000 ha, avec un rendement moyen de 10 tonnes à l'hectare (70).

Environ 80% de la production mondiale est destiné à la consommation humaine (70)Le manioc constitue en effet la nourriture de base de près de 500 millions de personnes dans le monde. Il est le quatrième aliment mondial en teneur énergétique après le riz, la canne à sucre et le maïs (50). Les racines sont consommées bouillies lorsqu'il s'agit de variétés douces. Dans le cas des variétés amères, après fermentation et/ou séchage, diverses préparations sont réalisées: gari, atieké, chikwangu, fufou, etc, ainsi que farinha de rapa, farina d'agua, kwako. Les feuilles sont également consommées dans certaines régions d'Afrique.

Outre l'utilisation des tubercules et feuilles pour l'alimentation, le manioc constitue également une matière de premier choix pour l'élaboration de produits de transformation tel que l'amidon. En Colombie, l'amidon est le produit de transformation le plus important. Il est aussi bien utilisé dans les industries alimentaires, textiles que papetières.

1.1.4 Collection, programme d'amélioration, génétique du manioc

1.1.4.1 Collections *ex situ*

Dans le monde entier, les collections *ex situ* du manioc sont représentées par environ 16000 accessions de *Manihot* spp. (53). Les principales collections sont situées au Centre International d'Agriculture Tropicale (CIAT, Cali, Colombie) (6000 accessions), à l'Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA, Ibadan, Nigéria) (2000 accessions), au Centre de Recherche sur les Plantes à Tubercules (CTRI, Inde) (1400 accessions), à l'Institut Sukarni d'Agriculture de Recherche pour les Plantes Alimentaires (SARIF, Indonésie) (954 accessions) et au Centre National de Ressources Génétiques (CENARGEN, Brasilia, Brésil) (924 accessions). La diversité génétique des cultivars au sein des collections de *M. esculenta* et des espèces sauvages a été étudiée sur la base des caractéristiques morphologiques des plantes, mais aussi à l'aide de marqueurs moléculaires (AFLP, microsatellite, RFLP, RAPD). Ces études ont été réalisées par différentes équipes de l'IRD, du CIAT et du CENARGEN (11, 29, 54, 192).

Les contraintes de coût et de travail liées à la maintenance et l'exploitation des ressources génétiques de ces collections ont conduit à la constitution d'une "core" collection de manioc (98). Au CIAT, la core collection est constituée de 630 accessions qui ont été

sélectionnées sur la base de leur origine géographique, caractères morphologiques, profils isoenzymatiques de l'enzyme alfa et beta-estérase et des critères d'intérêt agronomique particulier (qualité de la racine et des feuilles, productivité, résistance aux maladies et ravageurs) (98).

1.1.4.2 Programme d'amélioration

Généralement, la sélection de clones intéressants est réalisée au sein du pool des cultivars traditionnels. L'amélioration génétique du manioc est récente et a quatre objectifs principaux: accroître les rendements, obtenir des résistances aux principales maladies et ravageurs, adapter des cultivars aux nouvelles conditions culturales (précocité, tolérance à différents types de sols), améliorer la qualité des racines (teneur en amidon, toxicité cyanhydrique) (52, 88, 139). La stratégie d'amélioration est beaucoup plus simple dans le cas de cultures à propagation végétative et, dans le cas du manioc, est similaire à celle d'autres espèces allogames. Deux mécanismes différents sont utilisés pour augmenter la variabilité génétique chez le manioc: la pollinisation manuelle et la pollinisation ouverte contrôlée.

Les zones de culture du manioc se caractérisent par une grande diversité de conditions édaphiques et climatiques. Les résultats obtenus pendant plusieurs années sur l'étude de l'interaction de la plante avec le milieu physique et biologique ont conduit à la caractérisation de six zones édapho-climatiques (ECZ) adaptées à la culture du manioc (41) (Tableau 2). Le programme d'amélioration du manioc en Amérique Latine est basé sur la sélection de cultivars adaptés à chaque ECZ (41). Les ECZ ont été initialement décrites en Colombie. L'étude comparée des écosystèmes entre pays d'Amérique du Sud producteurs de manioc montre l'existence de similarités entre macro-environnements ce qui a conduit à la caractérisation d'écozones communes (36).

Le développement et le déploiement du germoplasme de manioc est réalisé au travers d'une sélection adaptative et récurrente du matériel, dans des régions représentatives des différentes ECZs. Les meilleurs clones (appelés clones "elite") sont sélectionnés pour leur adaptation aux conditions spécifiques de l'ECZ puis transférés aux programmes d'amélioration dans d'autres régions présentant des conditions édaphiques et écologiques identiques (100). La figure 3 représente le schéma de sélection utilisé dans le programme d'amélioration de manioc au CIAT (Figure 3).

L'évaluation au champ de la résistance des cultivars à un agent phytopathogène est généralement basée sur l'expression phénotypique des symptômes de la maladie. L'évaluation doit être réalisée dans un environnement favorable à l'expression de la maladie. Si les conditions sont optimales, les cultivars peuvent présenter des différences quant à leur niveau de résistance. Le choix des sites est donc très important pour une évaluation efficace de la résistance (89). Chez le manioc, la résistance aux agents pathogènes est évaluée sur plusieurs cycles successifs (135, 140), le matériel de plantation utilisé pour le cycle suivant provenant du cycle précédent.

1.1.4.3 Génétique

Toutes les espèces du genre *Manihot* possèdent $2n = 36$ chromosomes. Le manioc est une espèce allogame difficilement autofécondable. Le niveau d'hétérozygotie de l'espèce est très élevé (34, 111). la propagation se fait par voie végétative.

La carte génétique du manioc a été construite au CIAT en utilisant différents marqueurs (RFLP, RAPD, micro-satellites et isoenzymes) et est un support utile pour la localisation des gènes de résistance (78). Actuellement, une étude est développée au CIAT, sur la localisation des gènes de résistance (ou des QTL, "quantitative Trait Loci") à la bactériose vasculaire du manioc et à la mosaïque africaine. Les cultivars CM2177-2 et MNGA-2 ont été utilisés comme parents d'un croisement et présentent des réactions différentielles de résistance et sensibilité à différentes maladies dont la bactériose vasculaire du manioc (78). La population F1 est constituée de 150 individus (CM7857). Un rétrocroisement entre 5 individus de la population F1 et le cultivar MNGA-2 a été réalisé. Une progénie de 244 clones a été obtenue et est utilisée pour une cartographie plus fine de la résistance du manioc à différentes maladies (109).

1.1.5 Maladies du manioc

La mosaïque africaine est une maladie virale les plus importantes affectant la culture du manioc. Les pertes de rendement dues à cette maladie varient de 10 à 45%. Le virus est transmis par une mouche blanche (*Bemisia tabaci*). En milieu tropical humide, l'incidence de la maladie est étroitement liée au niveau des populations de l'agent vecteur (71). La maladie se manifeste par des taches jaunâtres sur les feuilles qui présentent ensuite des déformations puis un rabougrissement du limbe. L'emploi de cultivars résistants reste la méthode de lutte la plus efficace.

Trois bactéries attaquent les parties aériennes du manioc, dont deux *Xanthomonas*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* et *X. campestris* pv. *cassavae*, la première avec une aire de répartition correspondant à celle de la culture du manioc (Figure 4) et la deuxième étant présente seulement en Afrique. *X. a. pv. manihotis* est l'agent de la bactériose vasculaire du manioc et *X. c. pv. cassavae* celui de la nécrose bactérienne du manioc. En Amérique du Sud, la bactérie *E. carotovora* var. *carotovora* peut causer des dégâts importants (137).

En dehors de la mosaïque africaine et de la bactériose vasculaire, les principales maladies du manioc sont causées par des champignons phytopathogènes. Vingt maladies causées par des champignons ont été décrites (241). La plus importante est la pourriture molle des tubercules causée par au moins trois espèces de *Phytophthora*, *P. drechsleri*, *P. erythroseptica* et *P. cryptogea* (138). La destruction des racines peut être causée par d'autres parasites: *Diplodia manihotis*, *Armillaria spp.* *Fusarium spp.* et *Verticilium dahliae*. Sur feuilles on peut aussi observer des flétrissements causés par *Colletotrichum gloeosporoides*, des taches foliaires causées par *Cercosporia henningsii* et *C. viscosae* et des symptômes de super-élongation causés par *Sphaceloma manihoticola*.

1.2 La bactériose vasculaire du manioc

1.2.1 Distribution géographique

La bactériose vasculaire (Cassava Bacterial Blight ou CBB pour les anglo-saxons) est, selon les régions, un des principaux facteurs limitant la culture du manioc. La bactériose est causée par *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* et a été décrite pour la première fois au Brésil par Bondar en 1912 (20). Ensuite, elle fut décrite en Colombie et au Venezuela (134), en Equateur (175), et à Trinidad (110).

En Afrique la maladie a d'abord été observée au Nigeria en 1972 (243). Actuellement, elle est présente dans toutes les écozones de culture du manioc couvrant 15 pays de ce continent (248). Au Congo, en 1976, les premières prospections ont montré la présence de la maladie dans les régions des plateaux (61). Depuis, dans ce pays, la maladie est décrite dans toutes les régions de culture du manioc (231). Au Togo, la maladie est surtout présente dans les zones côtières (14). En République Centrafricaine, la maladie est présente dans les zones de savanes (61). La présence de la maladie a été aussi reportée au Zaïre (90), au Ghana, au Bénin, au Cameroun (179), au Kenya (171), en Tanzanie (168), en Ouganda (169, 172), et en Côte d'Ivoire (167). Il

est probable que la maladie ait été introduite en Afrique à partir d'Amérique du Sud par l'intermédiaire de boutures contaminées (147). En Asie, la maladie a fait son apparition dans les années 1970 et est présente en Indonésie, en Malaisie, en Thaïlande et à Taiwan (129).

1.2.2 Symptômes

La bactériose vasculaire du manioc affecte toutes les parties aériennes de la plante. Les symptômes sont plus fréquemment observés sur les feuilles et les tiges, les racines n'étant atteintes que pour des cultivars très sensibles (60, 135) *Xanthomonas axonopodis* sp. *manihotis* est une bactérie unique par la diversité des symptômes qu'elle induit (136) (Figure 5).

1.2.2.1 Symptômes foliaires

Après pénétration dans le mésophylle par des blessures ou par les stomates, la colonisation des espaces intercellulaires par le parasite conduit à l'apparition de taches anguleuses d'aspect gras et translucides (Figure 5A). Sur la face inférieure des feuilles, au niveau des taches, on observe des gouttes d'exsudats renfermant de nombreuses bactéries (Figure 5A). Seuls quelques limbes sont infectés durant les premiers stades de la maladie, mais au fur et à mesure que la bactérie progresse et se multiplie, les plages affectées s'étendent et fusionnent, prenant un aspect parcheminé (Figure 5B). Elles provoquent le flétrissement et l'abscission des feuilles (Figure 5C).

1.2.2.2 Symptômes sur tiges

Les taches sur tiges ont un aspect huileux et se développent sur les parties non-lignifiées. Il y a formation de craquelures d'où s'écoule un exsudat, mélange de latex, de polysaccharides extracellulaires d'origine bactérienne et, de bactéries (Figure 5D). De nombreuses lésions secondaires apparaissent le long des exsudats. Ces lésions évoluent en chancres (Figure 5E). Par sa nature systémique, la maladie s'accompagne d'un brunissement bien visible du système vasculaire au niveau des tiges. Lors de fortes attaques, la défoliation survient rapidement, laissant les tiges complètement dénudées, avec un flétrissement de l'apex et un dessèchement de la sommité (Figure 5F). Les premiers symptômes qui apparaissent après la plantation de boutures infectées sont le flétrissement des jeunes pousses rapidement suivi d'une nécrose apicale (141, 144).

1.2.3 Cycle de la maladie et épidémiologie

1.2.3.1 Cycle de la maladie

Les études portant sur le cycle de cette maladie ont été développées au Congo puis au Togo (16, 60). *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* est une bactérie à la fois épiphyte et vasculaire (135). Le cycle de la bactérie se caractérise par l'alternance d'une phase parasitaire en saison des pluies et d'une phase de survie en saison sèche (59) (Figure 6).

1.2.3.1.1 Développement épiphyte

Au début de la saison des pluies, la bactérie se multiplie sur la surface des feuilles. Le rôle principal du développement épiphyte est la formation d'un inoculum primaire qui permettra l'infection secondaire. Les populations épiphytes se maintiennent à un niveau élevé pendant la saison des pluies, diminuant quand les pluies cessent et n'étant plus détectables à la fin de la saison sèche (59).

1.2.3.1.2 Développement systémique

Les voies d'entrée de la bactérie sont les stomates et les blessures occasionées par les insectes, la pluie ou le vent. Pendant la saison des pluies, un film continu d'eau présent entre le mésophylle et la surface des feuilles permet à la bactérie de pénétrer par les stomates. La bactérie se multiplie rapidement lorsqu'elle se trouve dans le mésophylle et continue son développement dans les tissus vasculaires (233).

1.2.3.1.3 Conservation de la bactérie

Pendant la saison sèche, le parasite peut survivre dans les tiges pendant plusieurs mois. La bactérie ne se conserve pas dans le sol, mais elle assure sa conservation dans les débris végétaux, en épiphyte sur le manioc et également sur de mauvaises herbes. La bouture est l'élément principal de la transmission dans l'espace et dans le temps (d'un cycle cultural à l'autre) (60).

1.2.3.2 Epidémiologie

Lors des prospections réalisées en Amérique et en Afrique, une forte prévalence de la maladie a été observée en zone de savane, les zones forestières étant indemnes (16). L'influence des conditions écologiques et climatiques sur l'incidence de la maladie ont été étudiées (37, 66). L'incidence de CBB est plus élevée dans les régions où les températures moyennes du jour et de

la nuit sont de 20 à 25°C, que dans des régions où les températures moyennes sont de 25 à 30°C. Dans les régions où la différence de température entre le jour et la nuit est élevée, l'incidence de la maladie est sévère (214). Elle est également plus importante dans les régions où les sols sont pauvres et sableux (136).

Pendant la phase parasitaire, la dissémination à petite échelle est assurée par l'eau de pluie et de ruissellement et, par certains insectes tels que le criquet *Zonocerus variegatus* (62). Le principal mode de dissémination de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* est lié à la diffusion de boutures contaminées et à l'utilisation d'outils contaminés (136). L'utilisation de boutures infectées est la cause principale de transmission de la maladie d'un cycle à l'autre et de l'introduction du pathogène dans une nouvelle aire de production. La transmission de *Xam* par les graines contaminées est également possible (180).

1.2.4 Pertes

La maladie provoque des pertes de rendement en tubercules et également la perte du matériel de propagation (136). Les pertes de rendement peuvent atteindre 100% pendant la période des pluies (136, 243). Si des boutures contaminées sont utilisées dans un champ indemne de la maladie, les pertes occasionnées peuvent atteindre 30% du rendement. Si les conditions de l'environnement sont favorables au développement de la maladie, celles-ci peuvent atteindre 80% de la production à la fin du troisième cycle de production. En Afrique, les pertes de récolte ont été estimées entre 12 et 100% (178). En 1977, au Congo, dans certaines zones de production de manioc, les pertes de la récolte ont été de 100% (61). Au Zaïre, où les feuilles de manioc sont une source importante de protéine pour l'alimentation, les pertes de rendement ont entraîné une famine entre 1970 et 1975 (136).

En 1974 au Brésil, la bactériose a causé des pertes de rendement de plus de 50% dans des grandes plantations de manioc (plus de 10000 ha) et ce suite à l'utilisation de boutures contaminées (136). Les pertes de récolte dans d'autres pays d'Amérique du Sud varient entre 5 et 40% de la production.

1.2.5 Méthodes de lutte

Les connaissances acquises sur le cycle de la maladie permettent de proposer des méthodes de lutte simples. Elles sont basées sur un contrôle sanitaire rigoureux du matériel végétal et une modification des pratiques culturales (136). La qualité du matériel végétal destiné

à la propagation peut être améliorée par un tri sanitaire ou par la production de boutures saines dans des zones indemnes de maladie (zones forestière). La diffusion de cultivars sous forme de vitroplants sains et la prise en compte de mesure de quarantaine stricte visent également à limiter l'introduction et la dissémination de la maladie. Les pratiques culturales comme la fertilisation, l'élimination des mauvaises herbes, le décalage de la période de plantation et la rotation des cultures permettent améliorer les conditions de culture et limiter le développement parasitaire (136).

La lutte biologique est possible en utilisant des bactéries antagonistes comme *Pseudomonas* spp (136) mais les résultats obtenus ne montrent pas un réel succès. La lutte chimique en utilisant des composés cupriques s'est montrée inefficace (186). Le traitement des graines contaminées avec de l'eau chaude (20 min à 60°C) est efficace pour l'élimination de l'agent pathogène (180).

Jusqu'à présent, la méthode de lutte la plus appropriée est l'utilisation de cultivars résistants (140). La recherche de la résistance a été réalisée en développant des croisements entre *M. esculenta* et d'autres espèces et en utilisant les hybrides naturels du croisement entre *M. esculenta* et *M. glaziovii* (87). La résistance est probablement polygénique (88, 177). Au CIAT, 2000 cultivars ont été évalués en conditions contrôlées et au champ (33, 38, 39, 42-48). Aucun cultivar n'a montré une immunité totale à l'agent pathogène. En 1971, parmi les 1200 cultivars évalués, 21 ont montré un bon niveau de résistance (45). En 1975, les évaluations au champ et en serre ont montré une bonne corrélation suggérant que les méthodes d'évaluation de la résistance en serre sont appropriées pour la recherche d'une résistance durable en champ (40). Ces résultats ont été confirmés par Lozano et Laberry en 1982 (140). En 1994 toute la collection core du CIAT a été évaluée au champ dans une région où la maladie est endémique et 16 % des clones ont montré un bon niveau de résistance à la bactériose vasculaire du manioc.

Ces travaux ont débouché sur les conclusions suivantes: l'évaluation de la résistance à la bactériose doit se faire sur plusieurs cycles consécutifs et dans les localités représentatives des différentes zones écologiques où le manioc est cultivé. L'utilisation de cultivars résistants est fortement recommandée dans les zones où l'incidence de la maladie est élevée et où la maladie est endémique. Dans ces régions, les mesures de lutte phytosanitaire doivent être couplées à l'utilisation de cultivars résistants.

1.3 *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

1.3.1 Position taxonomique

L'agent causal de la bactériose vasculaire du manioc a été nommé successivement *Bacillus manihotis* Arthaud-Berthet (20), *Phytomonas manihotis* Arthaud-Berthet et Bondar-Viegas (234) et *Xanthomonas manihotis* (Arthaud Berthet) Starr (211). Dans les années 80, les définitions de genre et d'espèce pour les bactéries phytopathogènes ainsi que les critères de classification ont été précisés. Sur la base des caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques, l'agent causal de la bactériose du manioc a été classé dans le genre *Xanthomonas*, l'espèce *campestris* (65). Les pathovars ont été également définis et correspondent à des sous-espèces distinctes par leur caractéristiques de pouvoir pathogène sur une ou plusieurs plantes hôtes. L'espèce *campestris* regroupe 141 pathovars (224) chacun isolé à partir d'une espèce ou famille de plantes hôtes différente, les bactéries causant la bactériose vasculaire du manioc constituent le pathovar *manihotis*.

Avec le développement de nouvelles techniques permettant la caractérisation des bactéries phytopathogènes (sérologie, électrophorèse de protéines, chromatographie d'acides gras, analyse des génomes, homologues ADN/ADN), la classification en cours est devenue imprécise. La variabilité intraspécifique, de l'espèce *campestris* par exemple est plus grande que celle habituellement acceptée par les taxonomistes pour la délimitation de l'espèce (80, 255). En 1995, Vauterin *et al.* (223) ont procédé à une reclassification du genre *Xanthomonas* sur la base de l'homologie ADN/ADN et de la synthèse des données obtenues avec d'autres techniques (223). Le genre *Xanthomonas* contient alors 20 groupes d'homologie qui sont considérés comme des espèces (Tableau 3). L'espèce *axonopodis* a été proposée (en accord avec les règles de l'International Code of Nomenclature of Bacteria) pour différencier les bactéries de cette espèce d'autres *Xanthomonas* et notamment de celles de l'espèce *campestris*. L'agent causal de la bactériose vasculaire du manioc a été classé dans l'espèce *axonopodis*. Les deux espèces bactériennes pathogènes du manioc, *X. campestris* pv. *cassavae* et *X. axonopodis* pv. *manihotis* ont été classées dans des groupes d'homologie différents, les groupes 5 et 9 respectivement (Tableau 3) (223). Dans la suite de ce mémoire, nous ferons référence à la nomenclature proposée par Vauterin *et al.* (223), à savoir *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* et l'abréviation *Xam* pour *X. axonopodis* pv. *manihotis*.

1.3.2 Caractéristiques physiologiques

Lozano et Sequiera (141) ont décrit la bactérie *Xam* comme un batonnet fin, gram-négatif, de 0.7µm à 1.8µm de long et 0.4µm à 0.7µm de large et muni d'un flagelle polaire (Figure 7A, 7B et 7C). La bactérie est aérobie stricte, elle possède une catalase mais pas d'oxydase et ne réduit pas les nitrates. Elle n'induit pas de réaction d'hypersensibilité sur le tabac ni sur la tomate. La température optimale pour le développement de *Xam* est de 30°C (145). En culture, sur milieu nutritif gélosé, les colonies de *Xam* sont parfaitement circulaires, bombées et de couleur blanc-ivoire (Figure 7D).

1.3.3 Infection de la plante par *Xanthomonas*

1.3.3.1 Déterminants du pouvoir pathogène

Les termes de virulence, pathogénicité, agressivité et races ont été définis par différents auteurs et sont le sujet de plusieurs controverses essentiellement liées à la différence de terminologie utilisée (6, 195, 220, 221). Le tableau 4 indique les différentes définitions qui ont été proposées pour caractériser les composantes du pouvoir pathogène. Le pouvoir pathogène ou pathogénicité est l'aptitude d'un micro-organisme à interagir avec une plante, le résultat de l'interaction pouvant être la maladie ou l'absence de maladie. On peut distinguer deux composantes dans le pouvoir pathogène: une composante qualitative, la virulence, qui est l'aptitude à causer la maladie sur une plante et une composante quantitative, l'agressivité, qui est mesurée par la quantité de maladie ou par la gravité des symptômes qu'un agent pathogène virulent provoque. Une race ou pathotype est un groupe de souches qui partagent un phénotype de virulence commun par rapport à un groupe de variétés hôtes (30).

Une bactérie phytopathogène du genre *Xanthomonas* qui pénètre dans une plante peut être à l'origine de deux sortes d'interactions: une interaction compatible, qui conduit au développement de la maladie sur une plante hôte sensible, ou une interaction incompatible où la plante hôte résistante (ou une plante non-hôte) réagit à l'infection et la maladie ne se développe pas. L'interaction incompatible est en général caractérisée par une mort rapide et localisée des cellules de l'hôte au contact de la bactérie (réaction hypersensible ou RH) (115).

1.3.3.1.1 Gènes *hrp*

Chez la plupart des bactéries phytopathogènes, un groupe de gènes a été isolé dont la mutation provoque la perte de la capacité à induire la maladie sur les plantes hôtes sensibles et à

provoquer la RH sur les plantes hôtes résistantes ou sur les plantes non-hôtes (19). Ce groupe de gènes (appelés gènes *hrp* pour hypersensitive reaction and pathogenicity) varie par sa taille (22 à 35 kb pour une vingtaine de gènes), sa séquence, son organisation et son fonctionnement chez les bactéries phytopathogènes. Le locus *hrp* contient trois types de gènes: (1) ceux impliqués dans la régulation du groupe, (2) des gènes codant pour des protéines hautement homologues à celles des appareils sécrétoires de type III de certaines bactéries pathogènes des animaux (74) et, seulement mis en évidence sur *Erwinia* et *Pseudomonas* (96), (3) des gènes codant pour les harpines, protéines sécrétées par le système de type III, qui sont les seuls éliciteurs suffisant à la RH sur une plante non-hôte en conditions artificielles.

1.3.3.1.2 Gènes *avr*

Les gènes *avr* interviennent dans l'interaction plante-agent pathogène mais sont responsables de la spécificité d'hôte au niveau du cultivar: à un gène de résistance d'un cultivar correspond un gène d'avirulence d'une race de bactérie phytopathogène. La présence simultanée des deux gènes provoque une RH, tandis que si l'un ou les deux gènes sont absents, la maladie est induite par l'agent pathogène. C'est le principe de la relation gène pour gène définie par Flor en 1955 (77). Une trentaine de gènes d'avirulence ont été identifiés jusqu'à ce jour, dont une vingtaine chez les *Xanthomonas*. Ceux-ci sont de deux types (123):

- ceux qui répondent à la définition précédente de façon rigoureuse et déterminent la spécificité race/cultivar. Ils sont dénommés gènes d'avirulence homologues;
- ceux qui conditionnent la réaction non-hôte dénommés gènes d'avirulence hétérologues.

Faisant partie du premier type, les gènes *avrBs2* (18, 112) et *avrBs3*, isolées de *X. a. pv. vesicatoria*, possèdent des homologues chez de nombreux pathovars de *Xanthomonas* (*X. a. pv. malvacearum*, *X. a. pv. citri*, *X. c. pv. raphani* et *X. o. pv. oryzae*). La structure des gènes de cette famille est particulière puisque la région centrale est constituée de plusieurs répétitions (de 13,5 à 17,5) de la même séquence de 102 paires de bases dont le nombre et l'organisation semblent être responsables de la spécificité d'hôte (17).

Le gène *pthA*, isolé de *X. a. pv. citri* fait partie de la famille *avrBs3* mais répond à la deuxième définition des gènes d'avirulence puisqu'il rend à lui seul des tranconjugants de *X. a. pv. malvacearum* et *X. a. pv. phaseoli* non virulents sur leurs hôtes habituels avec parfois une

spécificité de cultivar (213). Pour *X. a. pv. citri*, *pthA* est également un déterminant de l'agressivité puisqu'il est indispensable à l'expression du pouvoir pathogène sur les agrumes.

De nombreuses hypothèses quant à l'interaction entre les protéines codées par les gènes d'avirulence et le système *hrp* ont été émises (123). L'avirulence (traduite par la RH) serait *hrp* dépendante et la régulation des gènes *avr* semble être liée à celle des gènes *hrp* (123). Les protéines Avr seraient modifiées ou couplées à d'autres molécules avant leur sécrétion hors de la bactérie. L'excrétion se ferait par l'intermédiaire du système *Hrc* qui injecterait les protéines dans les cellules végétales où elles seraient dirigées vers le noyau de la cellule végétale.

1.3.3.1.3 Autres facteurs affectant le pouvoir pathogène

Un certain nombre d'enzymes sont nécessaires pour le pouvoir pathogène des *Xanthomonas*. Leur mutation diminue en général l'agressivité des bactéries. Certains *Xanthomonas* produisent des toxines dont le rôle est important dans la symptomatologie, notamment pour l'apparition des chloroses. Un groupe de gènes responsables de la synthèse de l'albicidine par *X. albilineans* a été cloné (200). Les lipopolysaccharides (LPS) des *Xanthomonas* ont des effets toxiques sur les cellules animales mais aucun effet n'a été prouvé sur cellules végétales, bien que des mutants de *X. a. pv. citri* affectés dans la production de LPS aient une agressivité réduite sur leur plante hôte (113). Les exopolysaccharides (EPS) sont produits de façon importante par tous les *Xanthomonas* dont les colonies sont caractérisées par leur aspect muqueux: le xanthane est composé d'une squelette de cellulose sur lequel sont fixées des chaînes latérales de mannose-acide glucuronique-mannose. En plus d'un rôle dans la protection des bactéries contre les fortes températures, la dessiccation et les rayonnements U.V., les EPS ont un rôle dans le pouvoir pathogène. Chez *X. o. pv. oryzae*, *X. a. pv. citri* type E et *X. c. pv. campestris*, des mutations affectant la production d'EPS ont un effet sur l'agressivité des souches (113, 215, 216).

1.3.3.2 L'interaction *Xam* / manioc

Des études biochimiques et histochimiques de l'interaction *Xam* / manioc ont mis en évidence les mécanismes d'infection de la bactérie et les mécanismes de défense limitant le développement de *Xam* chez les plantes résistantes (15, 117). L'adhésion est le premier événement important dans les réactions hôte-parasite. Les propriétés adhésives de *Xam* diffèrent entre les souches agressives et non agressives (228). La prolifération intercellulaire dans les

parenchymes de la feuille est responsable de l'aspect gras et translucide des taches anguleuses perceptibles sur la face inférieure de la feuille (141). Du mésophylle, la propagation systémique de la bactérie se fait par les tissus du xylème (136). L'analyse histologique des tissus contaminés par des isolats de *Xam* montrent que la multiplication de la bactérie s'accompagne de la dégradation des cellules du mésophylle et empêche la formation d'une zone hyperplasique cicatricielle (13). L'enzyme pectinolytique majoritairement produite *in vitro* par *Xam* est une trans-éliminase (146). La bactérie produit également une toxine, l'acide 3-methylthiopropionique responsable des symptômes de brûlures foliaires (176).

1.3.3.3 Role des EPS et LPS

Le processus infectieux de *Xam* se caractérise par la présence d'une matrice fibrillaire peu chargée en composés denses aux électrons (15). Des études immunocytochimiques ont montré que cette matrice est composée d'exopolysaccharides (EPS) et accompagne la colonisation des tissus (15). Le polysaccharide, qui est produit en grande quantité *in vitro* par *Xam*, a la même composition monomérique que le xanthane (13). Les fonctions des EPS dans les interactions entre la bactérie et la plante sont multiples: barrière physique protectrice, reconnaissance cellule à cellule, importation ou immobilisation des molécules ioniquement chargées, etc (238). L'hydratation des EPS permet à la matrice d'exercer une pression qui facilite la progression de la bactérie (13). D'autres polysaccharides, les LPS (Lipopolysaccharides) ont été localisés dans la lamelle moyenne dégradée des cellules de l'hôte (15). Cependant, le rôle que jouent les LPS dans le pouvoir pathogène de *Xam* est inconnu (13).

1.3.3.4 Gène *avrBs3* homologue chez *Xam*

Chez *Xam*, un gène appartenant à la famille des gènes *avrBs3* a été caractérisé (230). Ce gène, nommé *pthB*, possède dans sa région centrale, 12.5 répétitions directes de 102 pb (Figure 8). Cette région se caractérise également par deux séquences répétées directes de 1kb flanquant le gène *pthB*. Ce gène est localisé sur un plasmide de 44kb présent chez *Xam*. Des copies sont également présentes dans l'ADN chromosomique de *Xam*. Un fragment *EcoRI* de 5.6 kb qui contient *pthB* a été utilisé comme sonde RFLP pour les études de diversité génétique (75, 229). Le rôle de *pthB* dans le pouvoir pathogène de *Xam* est en cours d'étude

Par ailleurs, un fragment homologue à *hrpB6* de *X. c. pv. vesicatoria* et *hrpB* de *Ralstonia solanacearum* a été amplifié chez *Xam*, à partir des amorces RST2 et RST3 (127). Ce

fragment, utilisé comme sonde hybride avec un fragment d'ADN génomique d'environ 14kb présent dans toutes les souches de *Xam* analysées (Verdier, communication personnelle).

1.3.3.5 Réactions de défense

Une étude en microscopie électronique à transmission a été conduite, visant à caractériser les réactions de défense des cultivars de manioc sensible et résistant infectés par *Xam*. Les résultats ont permis d'identifier les tissus vasculaires comme site privilégié des réactions de défense du manioc à la bactériose, mais également de montrer que certaines réponses sont spécifiques des variétés résistantes (15, 117). L'examen des réactions de défense a permis de proposer une stratégie de défense du manioc à l'encontre de *Xam*:

- La différenciation de réponses précoces dans la stèle (production de composés phénoliques, la biosynthèse de lignine et la production de callose);
- L'élicitation d'une série de réactions secondaires concernant le renforcement des barrières, dont la formation de papilles riches en lignine et/ou en polysaccharides, et la production de composés phénoliques qui diffusent dans les espaces intercellulaires et dans les vaisseaux où ils peuvent imprégner les EPS bactériens. Simultanément, un mécanisme active la libération de substances bactéricides par les thylls.
- Le développement de réponses tardives caractérisées par la synthèse de subérine, souvent associée à celle de la lignine pour bloquer la production d'inoculum secondaire.

Tous ces phénomènes contribuent à inhiber, chez le cultivar résistant, (1) la formation de poches de lyse phloémiennes qui sont responsables de la production d'un inoculum secondaire important et (2) la colonisation rapide de la plante par systémie. Cet aspect systémique du pouvoir pathogène chez *Xam* est un facteur important de l'incidence de la bactériose vasculaire du manioc car il assure l'extension de l'infection et la contamination du matériel végétal.

1.3.4 Etude de la variabilité de *Xam*

1.3.4.1 Modèle d'étude expérimental

Les phytobactériologistes pratiquent habituellement l'inoculation des tissus du mésophylle par l'infiltration de l'inoculum. Dans le cas du pathosystème *Xam* – manioc, différentes techniques d'inoculation ont été utilisées pour la caractérisation du pouvoir pathogène des souches: piqûre de tige, blessure circulaire du limbe foliaire (ou perforation du

foliole) (Figures 9A et 9B), coupure du limbe foliaire. Le tableau 5 résume les différentes techniques d'inoculation utilisées et résultats obtenus dans le cas du pathosystème manioc – *Xam*. Il est important de standardiser les techniques d'inoculation pour l'étude du pathosystème *Xam*-manioc, notamment si l'on veut pouvoir comparer les résultats entre laboratoires.

Fessehaie (75) a comparé différentes techniques d'inoculation pour la caractérisation des souches de *Xam*. Les techniques comparées sont: l'infiltration des feuilles avec une culture bactérienne, l'inoculation de feuilles détachées avec 10 ou 20 µl d'une culture bactérienne déposés sur la face inférieure des feuilles, la perforation du foliole avec un emporte - pièce et 10 µl d'une culture bactérienne placés sur la blessure, et la piqûre de tige avec un cure - dent portant une colonie bactérienne. Dans le cas du manioc, en infiltrant l'infiltration du limbe foliaire est difficile (13).

La technique d'inoculation par blessure circulaire est plus facile et économique en matériel végétal (13). Elle assure un type d'infection plus proche des conditions naturelles que l'infiltration (13). D'autre part, la piqûre de tige permet de s'affranchir de l'aspect pénétration des tissus et met en contact direct la bactérie avec les tissus vasculaires de la plante, là où les mécanismes de défense sont exprimés. Des études antérieures ont montré que la résistance de certains cultivars de manioc à *Xam* s'exprimaient seulement lors de la colonisation périvasculaire et vasculaire de la nervure et de la tige (117, 118).

1.3.4.2 Variabilité du pouvoir pathogène

Xam a un spectre d'hôte naturel très étroit. Après inoculation artificielle, des symptômes similaires à ceux observés sur le manioc peuvent être obtenus sur différentes espèces d'Euphorbiacées telles que *M. glaziovii*, *Euphorbia pulcherrima*, *Pedilanthus tithymaloides*. La variabilité du pouvoir pathogène de *Xam* a été décrite par un grand nombre d'auteurs (5, 34, 35, 37, 38, 67, 75, 86, 147, 193, 229, 248). L'agressivité des souches de *Xam* est très variable (tableau 5) et différentes classifications ont été proposées sans qu'une corrélation avec l'origine géographique des souches ait pu être mise en évidence (5, 67, 75). Takatsu *et al.* (214) et Maraite *et al.* (147) ont été les premiers à suggérer l'existence d'une interaction différentielle entre souches de *Xam* et cultivars de manioc. Cependant, ils recommandent d'utiliser un grand nombre de souches et de plantes par cultivar.

Le tableau 5 résume les études réalisées pour la caractérisation des interactions spécifiques souches de *Xam* X cultivars de manioc. Des interactions spécifiques souches x cultivars n'ont pas été démontrées dans les études de Maraite et Meyer (145), Elango et Lozano (67), et Fessehaie (75). Dans toutes ces études, chaque auteur utilise sa propre gamme d'hôte différentielle, ses souches de *Xam* et une technique d'inoculation spécifique. De même, la concentration d'inoculum utilisée lors de chaque expérimentation est variable.

1.3.4.3 Caractérisation physiologique et sérologique

En comparant des souches d'origines géographiques diverses, Lozano et Sequeira (141) ont observé des différences quant à leurs caractéristiques sérologiques et physiologiques. Les souches montrent une grande variabilité quant à l'activité amylase, les souches Africaines montrant une activité plus élevée et similaire à celle des souches de la côte Est d'Amérique du Sud (75, 147).

Grousseau *et al.* (86) ont mis en évidence une variabilité relativement limitée de la bactérie en étudiant 54 souches provenant de différents pays d'Afrique et d'Amérique. La variation de l'agressivité, la croissance sur différents substrats, la réponse à une gamme d'antibiotiques et la lysotypie ont été caractérisées. La synthèse des résultats montre qu'il existe un facteur commun et, notamment une corrélation entre l'agressivité des souches et leur comportement *in vitro*. L'auteur propose l'hypothèse d'une origine géographique commune des souches. Fessehaie (75) a utilisé le système Biolog pour étudier la variabilité métabolique de *Xam*. Les souches ont montré une diversité élevée et ont été classées dans 4 groupes (ou «clusters»). Les différences dans l'utilisation du carbone et de l'activité amylase n'ont pas été corrélées avec l'agressivité ni avec l'origine géographique des souches. Cependant, les études de l'activité amylase et des études de profils d'acides gras méthyl-ester (FAME de l'anglais Fatty acid methyl ester profiles) ont permis de différencier les souches africaines des autres. Les études sérologiques ont montré que le pathovar *manihotis* constitue un groupe phénotypiquement homogène et clairement différent de *X. c* pv. *cassavae* (75).

1.3.4.4 Variabilité génétique

La variabilité génétique à l'intérieur du pathovar *manihotis* a été étudiée par Verdier *et al.* (229, 231). Utilisant les profils de restriction de l'ADN ribosomal (ribotypage), 5 groupes ont été caractérisés. Les souches Africaines appartiennent toutes au groupe RNA-1. Les souches

d'Amérique du Sud se répartissent dans 5 groupes différents (groupes RNA 1, 2, 3, 4, et 5) (75, 231). L'étude du polymorphisme des fragments de restriction (RFLP) avec deux sondes génomiques (pBS6 et pBS8) a permis de différencier des sous-groupes à l'intérieur de chaque groupe RNA. La sonde pBS8 permet de différencier les souches africaines des souches d'Amérique du Sud (231). La sonde plasmidique (*pthB*) préalablement décrite (paragraphe 1.3.4.3), s'est avérée très discriminante pour la caractérisation des souches de *Xam* (8, 229, 231). Avec cette sonde, les souches africaines de *Xam* montrent des profils identiques à ceux des souches du Brésil et de la Colombie. Les souches présentes en Afrique proviennent très probablement d'Amérique du Sud (231). La diversité des souches *Xam* est très élevée en Amérique du Sud, alors qu'en Afrique elles montrent une structure de population clonale. Ceci s'explique par le fait que l'introduction de la bactérie sur le continent Africain est relativement récente. Par ailleurs, la pression de sélection exercée par la plante hôte est faible. En effet, la diversité des cultivars de manioc cultivés en Amérique du Sud est importante et est par contre faible en Afrique (126). Des études plus récentes mettent en évidence l'apparition de nouveaux haplotypes parmi les souches africaines et ce, dans les champs où de nombreux génotypes de manioc sont cultivés (8, 75).

1.4 Structure des populations d'agents phytopathogènes

Une population est un groupe d'individus partageant un pool génétique commun et présent dans une zone géographique limitée (un champ, une zone écologique) à un moment donné (151). Dans cette définition, le concept de métapopulation est inclus: les populations sont des groupes temporels d'individus qui ont des périodes d'extinction et de recolonisation successifs (170). Par structure de population on entend, le degré de diversité de la population, les relations génétiques entre les différents types présents dans cette population, la répartition dans le temps et l'espace de la diversité (130). Ces données sont à mettre en relation étroite avec les caractéristiques biologiques et l'épidémiologie des agents pathogènes (migrations, recombinaison génétique).

La connaissance de la structure des populations d'agents pathogènes est importante pour développer une stratégie de lutte efficace à long terme, notamment pour la sélection de cultivars résistants. La résistance variétale peut devenir inefficace pour différentes raisons: 1) une évaluation inadéquate des sources de résistance due à un mauvais échantillonnage des variants présents là où le cultivar est introduit, 2) l'évolution des populations de l'agent causal de la

maladie en fonction de la pression de l'hôte 3) les changements dans la répartition géographique de la diversité de l'agent pathogène (les migrations).

1.4.1 Facteurs affectant les populations des agents pathogènes

L'étude de l'évolution d'une population implique nécessairement une connaissance de la diversification, de la différenciation et de la distribution spatiale et temporelle de la diversité génétique de l'agent pathogène. Les facteurs qui influent sur l'évolution des populations peuvent être mis en évidence.

1.4.1.1 Sélection exercée par l'hôte

Parmi les facteurs qui agissent sur l'évolution de la structure des populations de l'agent pathogène, la pression de sélection exercée par l'hôte joue un rôle important (130, 154). La distribution géographique de la diversité de l'agent pathogène correspond en général à l'utilisation qui est faite de la résistance variétale au cours du temps (151).

En contrôlant la composition génétique des variétés, l'améliorateur agit sur l'aptitude écologique générale («fitness») de l'agent pathogène (181). La sélection exercée par l'hôte sur les populations de l'agent pathogène, agit à la fois sur les composantes spécifiques et non spécifiques du «fitness»: la virulence et l'agressivité (181). La sélection pour l'agressivité agit plus lentement que la sélection pour la virulence puisque plusieurs gènes sont impliqués. Le "fitness" des populations peut être estimé dans le cas de variétés sensibles, variétés multilignées, variétés fixées avec des gènes majeurs de résistance (128). La meilleure stratégie concernant le déploiement de variétés est celle qui doit conduire à une réduction du "fitness" de l'agent pathogène. L'efficacité de chaque stratégie développée dépend non seulement des gènes de résistance présents dans les variétés utilisées, mais aussi de certaines caractéristiques biologiques de l'agent pathogène (mode de reproduction, compétition) (128).

Les interactions riz / *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ont été largement étudiées et ont permis de mettre en évidence l'effet de l'hôte sur la structure des populations de l'agent pathogène. Les génotypes de riz nouvellement introduits favorisent l'apparition de nouvelles races dans la population de l'agent pathogène. Aux Philippines, la fréquence et la distribution des races et des groupes génétiques de *X. o.* pv. *oryzae* ont changé suite à l'introduction de variétés portant le gène de résistance *Xa-4* à la bactériose du riz (7, 32, 154). Ardales *et al.* (7) ont également étudié l'effet de l'hôte sur la variabilité des populations de l'agent pathogène.

Dans les champs cultivés avec une seule variété, la variabilité de l'agent pathogène est faible alors que dans les champs cultivés avec plusieurs variétés elle est très élevée (7).

1.4.1.2 Migration et flux de gènes

Deux facteurs importants sont le flux de gènes et les migrations. Parfois, les deux termes peuvent être utilisés comme synonymes si la migration est suivie par un échange de matériel génétique (208). La migration est un facteur important de la biologie de la plupart des agents pathogènes et a été extensivement étudiée en écologie (10). McDermott et McDonald (149) ont étudié le flux de gènes entre populations d'agents pathogènes et l'influence du flux génique sur la différenciation des populations soumise ou non à une sélection exercée par l'hôte ou l'environnement. Le mouvement de migrants et/ou le flux de gènes entre sous-populations réduisent considérablement la différenciation génétique de celles – ci et ne favorisent pas la sélection des allèles au sein d'une sous-population (208). L'équilibre entre la sélection et le flux de gènes décrit initialement par Haldane (91), résulte dans un système plante hôte-pathogène, dans la maintenance d'un allèle de virulence conférant un avantage sélectif positif (149).

Les migrations peuvent être détectées et étudiées par l'observation directe des mouvements d'individus et la distribution géographique de la variabilité, ou encore, par des méthodes indirectes basées sur l'analyse des fréquences alléliques ou génotypiques au sein des populations (149, 150, 246). La mise en évidence du flux génique entre populations est plus difficile. L'échange de matériel génétique occasionne des changements presque imperceptibles dans la structure des populations (130). Dans le cas des bactéries, l'échange de gènes peut avoir lieu par le transfert de plasmides. Par exemple, la présence de deux systèmes de modification (*XorI* et *XorII*) dans les souches de *X. oryzae* pv. *oryzae* a été étudié afin de mettre en évidence les mouvements migratoires des souches de *X. o.* pv. *oryzae* (32).

1.4.1.3 Recombinaison génétique

La recombinaison génétique influe sur la structure des populations des agents pathogènes. Dans le cas des bactéries pour lesquelles les populations sont essentiellement clonales, le rôle de la recombinaison génétique dans la variabilité des populations est minime. Cependant, Maynard-Smith *et al.* (148) montrent que les populations bactériennes présentent aussi bien une structure strictement clonale qu'une structure sexuelle. Le transfert horizontal de gène entre souches bactériennes peut être à l'origine de la variabilité génétique détectée au sein

des populations de l'agent pathogène (130). Le transfert de plasmide au sein des populations bactériennes a été démontré en conditions de laboratoire (156) et, il semble possible que ces échanges aient également lieu en conditions naturelles (105). La présence d'éléments mobiles dans le génome bactérien favorise les événements de recombinaison et influe sur la diversité génétique des souches (124). Dans le génome de certains *Xanthomonas*, des copies multiples de gènes d'avirulence ont été caractérisées (27). Des variations rapides de la structure des gènes *avr* peuvent avoir lieu avec un fort impact sur le spectre d'hôte.

Certains gènes répétés présentent de hautes fréquences de recombinaison dans le génome de bactéries comme *E. coli* ou *Salmonella typhimurium*. Par exemple, des recombinaisons liées à la présence de séquences répétées encadrant le gène de la toxine cholérique modifie le pouvoir pathogène de *Vibrio cholerae* (182). De telles recombinaisons homologues sont tout à fait envisageables pour les gènes d'avirulence de la famille de *avrBs3* qui sont présents en général en une dizaine de copies dans les génomes bactériens et dont les extrémités N et C-terminales sont hautement conservées. Il peut y avoir également des événements de recombinaisons internes au gène *avr*, concernant les petites répétitions situées dans le gène (250). Cette forte recombinaison des structures répétées (intergéniques ou intragéniques) impliquerait une évolution des gènes d'avirulence plus rapide que ce qui est communément rencontré.

Dans le cas des champignons phytopathogènes, la reproduction sexuelle joue un rôle important sur la structure de populations.

Les mutations et la dérive génétique sont d'autres facteurs qui agissent sur la variabilité des populations d'agents pathogènes.

1.4.2 Caractérisation de la variabilité des populations d'agents pathogènes

1.4.2.1 Etude du pouvoir pathogène

Plusieurs approches sont possibles pour caractériser la variabilité d'un agent pathogène. La méthode la plus utilisée est la détermination du spectre de virulence sur une gamme d'hôte différentielle. Le nombre de pathotypes ou races qui peut être détecté dépend du nombre de variétés différentielles utilisées. La caractérisation des réactions de virulence qui correspondent aux gènes de résistance des lignées améliorées est une information très utile pour l'améliorateur. Dans un programme d'amélioration, l'identification des virulences correspondant à un ensemble

de gènes de résistance sans importance agronomique n'a aucun intérêt (30). Les variétés de la gamme d'hôte différentielle doivent contenir les gènes de résistance qui sont utilisés au champ.

Des races ont été identifiées pour différents pathovars du genre *Xanthomonas*. Dans le cas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, sept races sur poivron et trois sur tomate ont été identifiées (106). Neuf races de *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* ont été caractérisées en utilisant onze cultivars de coton (185). Des interactions différentielles entre souches et cultivars ont aussi été caractérisées dans le cas de *X. populi* pv. *populi*, *X. c.* pv. *glycines*, *X. c.* pv. *phaseoli* et des races ont été proposées (99, 166, 256). Des races de *X. oryzae* pv. *oryzae* ont été caractérisées parmi des souches de Philippines, Japon, Indonésie, Inde et autres pays asiatiques (1, 153, 154, 253).

Dans le pathosystème *Xanthomonas fragariae* – fraisier, les races du pathogène ne sont pas identifiées. Les souches représentatives des variants génétiques les plus fréquemment rencontrés dans la population sont utilisés dans le but de caractériser le pouvoir pathogène, tester le matériel végétal et caractériser les gènes de résistance (194). La même stratégie a été utilisée par Xia *et al.* (249) pour la caractérisation du pouvoir pathogène des souches de *Pyricularia grisea*. Des souches appartenant à la même lignée ont montré le même phénotype de virulence après inoculation sur la gamme d'hôte. Des souches de lignées différentes ont montré des phénotypes différents (249).

Cependant, l'analyse de la structure des pathotypes ou races présente plusieurs inconvénients. Elle requiert l'établissement d'une gamme d'hôte différentielle génétiquement bien caractérisée, ce qui nécessite beaucoup d'efforts et de temps. De plus, certains pathotypes ne peuvent pas être caractérisés si la gamme d'hôte ne possède pas les gènes de résistance correspondants aux gènes de virulence de l'agent pathogène. Pour le pathosystème riz-*Pyricularia grisea*, une gamme internationale d'hôtes différentielle a été établie après trois ans d'études et un énorme effort de coopération entre plusieurs équipes de recherche (173). En 1993, Correa-Victoria et Zeigler (56) ont montré, en utilisant des variétés commerciales, que pour les deux races de *P. grisea* les plus fréquentes en Colombie, il existait six groupes de virulence différents. Ce résultat confirme l'idée que les gammes d'hôtes doivent inclure des variétés commerciales locales (56).

Les gènes impliqués dans le pouvoir pathogène représentent une petite portion des gènes de l'agent pathogène et de plus ils sont soumis à la pression de sélection exercée par l'hôte (130).

La structure de population d'un agent pathogène étudiée uniquement avec des données de virulence, ne reflète pas toute la diversité génétique de la population, ni son histoire évolutive, ni le potentiel de variation des souches (151).

1.4.2.2 Caractérisation moléculaire

Ces dernières années, le développement des marqueurs moléculaires a permis d'obtenir beaucoup d'informations sur la structure génétique des populations d'agents pathogènes (149). L'objectif est d'obtenir une empreinte génétique unique et caractéristique de chaque individu ou d'un groupe d'individus ayant une signification biologique (par exemple un groupe d'organismes présent dans une localité géographique). Cela permet également de comprendre les relations génétiques existant entre les différents individus, groupes d'individus ou sous-populations. Les méthodes moléculaires ont été également développées pour les études de taxonomie et de diagnostic des agents phytopathogènes.

Les conclusions que l'on peut faire sur la structure de population d'un agent pathogène dépendent étroitement du marqueur utilisé pour estimer la diversité génétique (130, 164). Nelson *et al.* (164) montrent que l'estimation de la diversité génétique dépend de la sonde RFLP utilisée. En général, une grande quantité d'information est obtenue en utilisant un marqueur qui possède un pouvoir discriminant élevé et qui détecte donc plus de polymorphisme (AFLP par rapport aux isoenzymes). Cependant, un marqueur très informatif ou polymorphe peut masquer certaines relations entre souches.

Dans le cas du pathosystème riz - *X. oryzae* pv. *oryzae*, certaines sondes RFLP utilisées pour les études de diversité, la séquence insertionnelle IS112 et des gènes d'avirulence, peuvent de par leur nature mutagénique ou parce qu'elles sont soumises à la sélection, résulter dans une mesure exagérée de la diversité. De plus, certaines différences dans l'organisation génomique, par exemple celles des systèmes de modification, peuvent être masquées. Ainsi, l'utilisation de plusieurs marqueurs représentant différents aspects de la variabilité est importante pour les études phylogénétiques (32).

Des critères importants vont déterminer le choix des marqueurs moléculaires utilisés pour l'étude de la structure des populations. Parmi eux: leur simplicité d'utilisation, la reproductibilité des résultats obtenus, l'identification sans ambiguïté des fragments d'ADN. Dans

le cas des organismes diploïdes, les hétérozygotes doivent pouvoir être différenciés des homozygotes (25).

Le choix des marqueurs génétiques pour étudier la variabilité d'une population donnée est important. En 1987, Michelmore et Hulbert (155) ont publié une liste des techniques disponibles. La liste des méthodes permettant de caractériser la variabilité génétique des microorganismes phytopathogènes qui suit est loin d'être exhaustive. Nous décrivons ci-après les techniques les plus utilisées et leurs applications.

1.4.2.2.1 Analyse du polymorphisme des fragments de restriction (RFLP)

L'analyse du polymorphisme des fragments de restriction ou RFLP est une des techniques les plus utilisées. Les sondes d'ADN utilisées en RFLP peuvent être: des éléments répétés du génome (24, 132, 231); des séquences insertionnelles (IS) (81, 122), des gènes d'avirulence (164), des gènes *hrp* (2, 97), des gènes codant pour des déterminants du pouvoir pathogène (55, 57), des éléments transposables (164), des séquences codant pour les ADN ribosomiaux 16S et 23S d'*Escherichia coli* (12, 24, 64, 231), des sondes simple copie ou peu répétées (198). Les RFLP peuvent aussi être réalisés avec un enzyme qui coupe peu fréquemment, le polymorphisme est alors analysé en électrophorèse à champ pulsé (PFGE de l'anglais pulse field gel electrophoresis) (106, 199, 251).

1.4.2.2.2 La technique PCR

Les techniques basées sur la PCR (de l'anglais "Polymerase chain reaction") ont été très utilisées pour le typage moléculaire de souches bactériennes. La technique RAPD (de l'anglais "Random Amplified Polymorphic DNA", ADN polymorphe amplifié au hasard) permet d'évaluer la diversité génomique à partir de la distribution de séquences aléatoires dans le génome (242). L'amplification aléatoire a permis de mettre en évidence une variabilité intraspécifique de *Septosphaeria turcica* (21) et de *Colletotrichum lindemuthianum* (207). Il est possible de différencier les races de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (9), les groupes de pathogénicité de *Leptosphaeria maculans* (235), et de grouper les souches de *Erwinia amylovora* en fonction de leur hôte d'origine (157).

La REP-PCR est une PCR qui utilise des amorces contruites à partir de séquences d'ADN d'entérobactéries extragéniques conservées et répétées (REP, de l'anglais répétitive

extragenic palindromic; ERIC, enterobacterial repetitive intergenic consensus et les séquences BOX) (133). Initialement utilisée chez les Rhizobiacées, cette méthode permet d'obtenir des empreintes génétiques spécifiques permettant l'identification des bactéries (63). Cette technique s'est avérée performante pour la caractérisation et la différenciation de souches de *Pseudomonas* et *Xanthomonas* au niveau infra-pathovar (133, 184, 194, 227).

Des amorces spécifiques, par exemple des amorces correspondant au locus *Tox2* qui code pour la toxine HC produite par *Cochliobolus carbonum* peuvent être utilisées (107). L'amplification de la région ITS (de l'anglais internal transcribed spacer region) (207) suivie ou non d'une analyse du profil de restriction de l'amplification a été utilisée pour l'étude de la variabilité de *Colletotrichum lindemuthianum* dans trois centres de diversité de la plante hôte, *Phaseolus vulgaris*. La PCR "Arbitrarily primed" (AP-PCR) (239) et l'analyse RFLP après amplification des régions correspondant à des séquences rDNA ont aussi été utilisées pour la caractérisation de différents pathovars du genre *Xanthomonas* (*X. c. pvs. cerealis, hordei, secalis, translucens, undulosa, arrhenatheri, graminis, phlei, phleipratensis*, et *poae*) et pour l'étude de la variabilité de *Pseudomonas fuscovaginae* (103, 142).

L'analyse des fragments de restriction ou REA (Restriction endonuclease analysis) a été utilisée pour la caractérisation de la variabilité intraspécifique de *Xanthomonas campestris* (2) et de *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* (254). Chez les bactéries du genre *Xanthomonas* (*X. c. pv. citri*, *X. a. pv. manihotis*, *X. c. pv. vesicatoria*), l'analyse des plasmides (présence/ absence et/ou profils de restriction) s'est avérée très utile pour la caractérisation des souches (28, 121, 187, 228).

Récemment, la technique AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism", Polymorphisme de longueur des fragments d'amplification) (236) développée pour l'identification des polymorphismes entre génotypes végétaux (236) s'est avérée très utile pour l'étude des populations de microorganismes (23, 83, 102, 143). L'ADN est digéré avec deux types d'enzymes: l'une coupant plus fréquemment que l'autre. Des séquences courtes (adaptateurs) sont liés aux produits de la digestion afin de pouvoir les amplifier avec des amorces sélectives. Les amorces possèdent en plus de la séquence adaptatrice 1, 2 ou 3 nucléotides supplémentaires (Figure 10).

Les microsatellites ont été aussi appliqués à l'étude de la variabilité de champignons endophytes (84) et de *Phytophthora cactorum* (94). L'analyse RAMS (de l'anglais "random

amplified microsatellites”) est une méthode qui combine l’emploi d’une amorce RAPD et d’une amorce microsatellite. Elle a été utilisée pour caractériser la variabilité de plusieurs champignons (*Armillaria cepistipes*, *Gremmeniella abietina*, *Heterobasidion annosum*) (93). L’analyse SAMPL (“selectively amplified microsatellite polymorphic loci”; microsatellites polymorphes amplifiés de manière sélective) combine l’emploi d’une amorce AFLP et d’une amorce microsatellite. Jusqu’à ce jour elle n’a été appliquée que pour la caractérisation de la variabilité de plantes (244) mais peut être développée pour l’étude de la variabilité d’agents phytopathogènes.

1.4.3 Indices de diversité et études phénétiques

1.4.3.1 Echantillonnage

L’échantillonnage est un élément clé pour l’étude de structure des populations. Les conclusions que l’on peut tirer des études de structure des populations d’un agent pathogène et de son évolution sont étroitement liées à la stratégie d’échantillonnage utilisée. Celle ci dépend de la manière dont la diversité est distribuée dans l’espace (130). Un meilleur échantillonnage pourra être réalisé si cette distribution est connue.

La probabilité de détecter des variants peu fréquents dans la population, dépend du nombre de souches collectées. Ceci est expliqué par la formule: $N = \log(1-P)/\log(1-F)$ où N est la taille de l’échantillon, F, la fréquence de l’haplotype ou pathotype détecté et P, la probabilité de détecter des haplotypes ou pathotypes avec la fréquence F (150). Si P est établi arbitrairement à 95%, avec des échantillons (N) contenant 98 et 105 individus, des haplotypes ou pathotypes avec des fréquences de présence de 0.028 et 0.030 respectivement pourront être détectés.

La taille de l’échantillon et la stratégie d’échantillonnage utilisées dépend également du pathosystème étudié. Ardales *et al.* (7) ont réalisé une étude afin de déterminer la corrélation qui existe entre la taille de l’échantillon et la diversité détectée chez *X. oryzae* pv. *oryzae*. Ils recommandent de collecter un nombre réduit d’échantillons sur un grand nombre de sites plutôt que de collecter un grand nombre d’échantillons par site.

1.4.3.2 Analyse de diversité

La diversité au sein des espèces animales et végétales a été largement étudiée en écologie. La plupart des indices de diversité qui sont utilisés dans les études de population d’agents pathogènes sont ceux décrits en écologie animale et végétale (240). Les indices les plus utilisés

sont ceux de Shannon, de Simpson (119, 240) et de Nei et Tajima (161). Les définitions sont données ci-dessous.

1.4.3.2.1 Les indices de diversité

En général, le calcul des fréquences géniques est utilisé pour étudier la diversité d'une population. Nei et Tajima (161) proposent un indice de diversité (H) défini comme la probabilité d'obtenir deux allèles différents pour un même locus lorsque l'on considère deux individus haploïdes. Cet indice est applicable à l'étude de population sexuelle ou asexuelle et, a été utilisé pour l'étude des populations de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* et ce, à différents niveaux géographiques (1, 7, 124, 227). L'indice de diversité génétique est calculé selon la formule:

$H = ((n/(n-1)) * (1 - \sum X_i^2))$ où X_i est la fréquence de l'allèle i , et n le nombre de souches étudiées.

La variabilité génétique peut aussi être estimée par la fréquence d'un génotype (ou haplotype) ou d'un pathotype dans une population. La fréquence des allèles est alors remplacée dans la formule par la fréquence des haplotypes ou des pathotypes.

Les indices de Shannon et de Simpson sont donnés par les formules respectives (119):

$SI = - \sum p_i \ln p_i$ où p_i est la fréquence des souches dans la classe génétique ou phénotypique i .

$\lambda = \sum_{i=1}^s n_i (n_i - 1) / n(n-1)$ où n_i est le nombre d'isolats pour l'haplotype ou pathotype i , n , le nombre de souches et s , le nombre des haplotypes ou pathotypes différents dans l'échantillon.

Certaines critiques ont été faites quant à l'utilisation des indices de diversité pour l'étude de la variabilité génétique des populations bactériennes (237). Il est en effet difficile de définir une espèce bactérienne et, le choix arbitraire d'un pourcentage de similarité pour définir une espèce ou un biotype, peut entraîner des problèmes statistiques. Un indice a d'ailleurs été proposé pour lequel la distance taxonomique moyenne entre toutes les paires de souches est utilisée et l'unité taxonomique n'est pas nécessaire (237).

Trois aspects doivent être considérés dans le choix et le calcul des indices de diversité:

- 1) La taille de l'échantillon qui influe sur la valeur de l'indice de diversité. Par ailleurs, l'effet de la taille de l'échantillon dépend de certaines caractéristiques biologiques du microorganisme, qui dépendent elles même des conditions de l'environnement. Müller *et al.* (158) ont montré que l'indice de diversité de Simpson, contrairement à celui de Shannon, est indépendant de la taille de l'échantillon pour *Erysiphe graminis* f. *sp. hordei*. La même

conclusion a été faite par Groth et Roelf pour les populations de *Puccinia graminis*, (85). Sheldon (206) propose un indice de Shannon corrigé et qui devient indépendant de la taille de l'échantillon. L'indice de Nei est indépendant de la taille de l'échantillon (198) si celui-ci est supérieur à 30 individus.

- 2) Les indices les plus utilisés prennent en compte deux aspects différents: la richesse (par exemple le nombre d'haplotypes différents dans un échantillon par rapport à sa taille) et l'égalité ou l'inégalité de la distribution des individus en différents types. L'interprétation des résultats doit prendre en compte l'importance de chacune de ses deux composantes. Là encore, les deux composantes de l'indice de diversité dépendent de la taille de l'échantillon. Une analyse de sous-échantillonnage permet d'estimer le nombre et la fréquence esperés d'échantillons de même taille et ainsi de corriger les biais introduits par l'effet de la taille de l'échantillon (158).
- 3) Les indices de diversité ne renseignent pas sur la similarité ou dissimilarité entre les individus (158). Müller *et al.* (158) proposent d'utiliser un indice de dissimilarité qui renseigne sur les distances génétiques entre haplotypes ou pathotypes dans la population.

Groth et Roelfs (85) concluent que plusieurs indices de diversité doivent être calculés pour une meilleure description d'une population. Les indices de Simpson et Shannon représentent la valeur absolue de la diversité. Un autre indice comme celui proposé par Müller *et al.* (158), peut être utilisé pour comparer les différences de diversité entre populations. Cet indice prend en compte le nombre, la fréquence et l'identité des classes génétiques ou phénotypiques. Les études de diversité peuvent être réalisées en parallèle avec les études sur les relations phylogénétiques entre individus.

1.4.3.2.2 Différenciation de la diversité

Un aspect important de la génétique des populations d'agents pathogènes est la différenciation de la diversité à l'intérieur d'une même population, causée soit par l'isolement géographique, soit par la pression exercée par l'hôte. Wright (247) a été le premier à proposer une méthode d'analyse pour déterminer la structure des populations. Dans le cas d'une population où la reproduction est non-aléatoire, l'indice de Wright, F_{ST} permet de mesurer la différenciation d'une sous-population par rapport à l'ensemble de la population. La

différenciation entre sous-populations d'un agent pathogène haploïde ou asexué peut être calculée selon la formule proposée par Nei et Tajima (161):

$G_{ST} = (H_T - H_X) / H_T$ où H_X est la diversité génétique moyenne des sous-populations (par exemple: races, souches collectées dans une même localité) et H_T l'indice de diversité génétique totale de la population. Le coefficient G permet de déterminer la contribution des différents facteurs comme: l'existence de races, l'origine géographique, sur la structure de la population de l'agent pathogène. L'indice G_{ST} permet aussi de calculer le flux génique défini par la formule suivante:

$N*m = (1 - G_{ST}) / (4a * G_{ST})$ où N est le nombre d'individus d'un groupe de souches ou sous-population, $a = (n/n-1)^2$, m est la proportion de gènes échangés à chaque génération dans un groupe. $N*m$ est une mesure du flux génique dans la population (208). Dans cette formule, G_{ST} peut être remplacé par F_{ST} ou l'indice ϕ_{ST} qui sera expliqué dans le paragraphe suivant.

Récemment, le logiciel Arlequin a été proposé pour l'analyse de la structure des populations (203). Ce logiciel permet d'analyser plusieurs types de données haplotypiques ou génotypiques (séquences d'ADN, RFLP, micro-satellites, analyses multilocus et de calculer des fréquences alléliques). Le logiciel offre plusieurs méthodes d'analyse intra et inter-populations. A un niveau intra-population, le calcul d'indice de diversité, les calculs de la diversité moléculaire et du déséquilibre de liaison sont possibles. Pour les études inter-population, l'AMOVA (69) ou l'analyse de la variation moléculaire (Analysis of MOlecular VAriance) est la plus utilisée (92, 207). Elle analyse la structure des populations utilisant une analyse de variance (ANOVA) pour calculer les composants de la variation moléculaire à différents niveaux hiérarchiques. Un indice ϕ_{ST} analogue à F_{ST} est calculé et donne une estimation de la corrélation de la diversité haplotypique entre populations et ce, à différents niveaux (par exemple pays, région, localité, champ) (69). L'avantage de cet indice ϕ est qu'il reflète la structure des populations indépendamment du locus utilisé dans l'analyse (69). Il peut donc être estimé pour différents marqueurs moléculaires et la moyenne obtenue donne une meilleure estimation de la différenciation génétique. Le niveau de signification de l'indice ϕ est calculé par une approche de permutation (bootstrap, voir paragraphe suivant) éliminant ainsi les hypothèses de normalités inappropriées pour les données moléculaires (69).

1.4.3.3 Analyses phénétiques

Les données morphologiques, sérologiques, génétiques, haplotypiques ou pathotypiques acquises permettent de construire des dendrogrammes. Ceux-ci montrent, d'une manière graphique, les relations existants entre individus. Les données sont transformées en fréquence génétique ou en code représentant les différents allèles d'un locus. Si les allèles ne sont pas connus, la présence ou absence d'un caractère (par exemple une bande d'un profil de bandes) sont représentées par 1 et 0 respectivement. Ces matrices sont ensuite utilisées pour construire des matrices de similarité. Un dendrogramme est construit, dans lequel les individus sont assignés à un groupe (ou cluster en anglais) par une stratégie dite de regroupement (ou de clustering). Plusieurs logiciels sont actuellement disponibles pour la construction des dendrogrammes: NTSYS (197) est un des plus utilisés.

Les indices de similarité (209) les plus utilisés sont ceux de Dice (ou Nei-Li) (160) et celui de Jaccard (101) (Jaccard, 1908). L'indice de Jaccard a été très utilisé pour caractériser les populations de bactéries phytopathogènes (1, 24, 227).

Les formules respectives sont:

$$S = 2a / (2a + b + c) \quad (160)$$

$$\text{et } S = a / (a + b + c) \quad (101)$$

où a est le nombre de bandes présentes dans les deux profils, b, le nombre de bandes présentes seulement dans un profil, c, le nombre de bandes présentes dans l'autre profil.

Ces deux indices se différencient d'autres indices comme les indices de Sokal et Sneath (209) qui utilisent une autre variable, d: nombre de bandes absentes dans les deux profils, qui n'a pas de signification biologique dans le cas du typage moléculaire. La différence observée entre les dendrogrammes construits en utilisant l'indice de Nei-Li ou celui de Jaccard réside non pas dans la topologie (relations entre individus) mais dans l'échelle de similarité.

Le choix de la méthode de clustering dépend des objectifs de l'étude et de la nature des données. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées et la comparaison des résultats obtenus peut aider à choisir la meilleure représentation des données, c'est à dire celle qui permettra d'établir une corrélation entre l'analyse phénétique et les caractéristiques biologiques de l'agent pathogène (188).

Les méthodes de clustering peuvent être agglomératives, divisives, hiérarchiques, séquentielles, locales, directes pondérées, adaptatives... (pour une revue voir Sneath and Sokal, (209)). Les méthodes les plus utilisées en biologie sont celles appelées SAHN (Sequential, Agglomerative Hierarchical, Non overlapping) dont la méthode de la distance moyenne ou UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages). Cette méthode détermine la similarité ou la distance entre deux groupes, par le calcul de la distance moyenne entre chaque individus des deux groupes (la distance est définie comme $D = 1 - \text{similarité}$). La robustesse d'un dendrogramme peut être établie par une analyse de "bootstrap" (72, 252). L'arbre est reconstruit un certain nombre de fois en utilisant un sous-échantillonnage des données. La fréquence avec laquelle un groupe donné du dendrogramme est reconstruit reflète la robustesse de ce groupe.

Les analyses multivariées («ordination methods» en anglais) sont aussi utilisées pour le regroupement des individus. Les analyses de correspondance simple et multiple sont un exemple de ces méthodes (192, 202). L'analyse de correspondance localise toutes les catégories dans un espace euclidien où les dimensions représentent les combinaisons des variables originelles (les bandes dans le cas d'une analyse moléculaire). Pour une analyse de correspondance simple, la valeur absolue de chaque dimension est le pourcentage de la variance totale expliquée par cette dimension. Pour l'analyse de correspondance multiple, la valeur de chaque dimension doit être considérablement différente de celle d'une autre dimension mais, la variance est préétablie et non donnée par les valeurs des dimensions. Les relations entre individus peuvent être observées dans des graphiques en trois dimensions (202). Dans une analyse de correspondance, trois paramètres statistiques sont calculés pour déterminer le nombre de clusters statistiquement significatifs: Pseudo F , Pseudo t^2 et le critère cubique d'agroupement (1).

Par opposition aux méthodes phénétiques pour lesquelles l'agroupement est réalisé sur la base d'une similarité globale sans implication d'ordre évolutif, il existe des méthodes cladistiques (ou phylogénétiques ou phylétiques) où les individus d'un même groupe ont un ancêtre commun. Les méthodes de regroupement, connues comme méthodes de parsimonie maximale permettent de construire des arbres ou cladogrammes qui représentent la relation ancêtre-descendant. Pour cette méthode de clustering, les données (par exemple présence ou absence d'une bande) sont utilisées directement et l'analyse suppose que les changements évolutifs suivent les voies évolutives les plus probables, c'est à dire celles qui requièrent le moins

de changement possible (209). Plusieurs logiciels sont disponibles pour la construction des cladogrammes dont le logiciel PHYLIP (73).

1.4.4 Analyse de la structure des populations et résistance variétale

Les principales étapes d'un programme d'amélioration pour la résistance sont: (1) l'identification de génotypes résistants, (2) l'évaluation des génotypes avec des sous-populations de l'agent pathogène et (3) l'introduction des génotypes au champ. La caractérisation des populations de l'agent phytopathogène va fournir les informations nécessaires pour la réalisation de chacune de ces étapes.

La caractérisation de la résistance variétale peut être réalisée soit en inoculant le matériel végétal en conditions contrôlées et avec des souches choisies, soit en évaluant le matériel au champ dans des localités où l'incidence de la maladie et la diversité des populations de l'agent pathogène sont élevées (56). La caractérisation préalable du pouvoir pathogène des souches de l'agent pathogène est importante pour orienter le choix des souches à utiliser. La sélection des sites les plus adéquats pour l'évaluation en champ du matériel végétal, dépend également des informations obtenues sur la structure des populations de l'agent pathogène.

Le spectre de résistance / sensibilité des génotypes choisis doit être ensuite établi vis à vis d'une sous - population de l'agent pathogène. Ces sous-populations peuvent être des pathotypes, des haplotypes, ou des sous-populations écosystème-spécifiques (130). Si des pathotypes ou races physiologiques n'ont pas encore été identifiés, la caractérisation génétique de la population peut orienter le choix des souches à utiliser pour l'évaluation de la résistance. Dans tous les cas, il est intéressant de déterminer la corrélation entre phylogénie et structure pathotypique de la population (130). Si une corrélation est établie, la caractérisation moléculaire peut être utilisée comme un outil permettant ensuite l'identification des pathotypes ou races.

La corrélation entre la structure pathotypique et la structure haplotypique d'une population peut aider à comprendre quelle est l'influence de l'introduction de génotypes résistants sur la dynamique des populations de l'agent pathogène. Deux exemples illustrent cela: *Pyricularia grisea* et *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* sur le riz. Dans le premier cas, la caractérisation moléculaire des souches a permis d'établir des lignées phylogénétiques du champignon (257). Celles ci ont été utilisées pour établir les relations phylogénétiques et évolutives des pathotypes (132). Une amélioration de la résistance vis à vis des lignées du

champignon a été proposée, en définissant un pathotype composite pour chaque lignée (131, 257). Ainsi, des croisements entre variétés résistantes à deux ou trois lignées différentes sont réalisés, permettant d'obtenir un génotype de riz résistant à presque tous les lignées du champignon. Cependant, un certain nombre de pathotypes peu fréquents dans la population peuvent ne pas être détectés et pourraient être la cause du contournement de la résistance (56).

Les nombreux travaux sur *X. o. pv. oryzae* ont permis de mieux comprendre l'interaction hôte-parasite (32, 122, 124, 153, 164). L'influence des pratiques culturales et de l'introduction de gènes de résistance sur la dynamique des populations de *X. o. pv. oryzae* ont été étudiés. La diversité au sein des populations de *X. o. pv. oryzae* a été analysée à la fois dans le temps et sur plusieurs échelles géographiques (1, 7). Les différentes approches sur l'étude de ce pathosystème ont permis d'établir (1) les relations génétiques entre les populations du pathogène dans différents pays, (2) les mouvements, naturels ou provoqués par l'homme, de l'agent pathogène, et (3) la corrélation entre la structure des races de *X. o. pv. oryzae* et la structure en lignées phylogénétiques.

L'information obtenue sur la structure des populations de l'agent pathogène peut aider dans le choix d'une stratégie d'introduction de variétés résistantes. Les populations présentant des niveaux élevés de variation génétique s'adapteront plus facilement aux hôtes résistants, ce dont il faut tenir compte dans le choix du type de résistance à utiliser.

1.5 Composition du mémoire et objectifs

Le travail présenté dans ce mémoire est articulé autour de trois objectifs majeurs. Le premier est d'orienter le choix des souches de *Xam* qui seront utilisées pour l'évaluation de la résistance des cultivars de manioc vis à vis à la bactériose. Pour cela, nous nous proposons de caractériser les populations de *Xam* présentes dans les principales régions de culture du manioc en Colombie. Notre second objectif est de proposer une gamme d'hôte différentielle qui peut servir de référence pour l'évaluation des pathotypes de *Xanthomonas axonopodis* *pv. manihotis* en Colombie. Le troisième objectif est d'étudier la dynamique des populations de *Xam* et les facteurs qui peuvent entraîner des changements dans la structure des populations.

Le premier chapitre présente les résultats acquis sur la caractérisation génétique des souches de *Xam* en Colombie et le développement d'outils moléculaires adaptés à l'étude de *Xam*. Le développement et la mise au point de la technique AFLP (Polymorphisme de longueur

des fragments d'amplification) pour l'étude de la variabilité de *Xam* est présentée dans ce chapitre.

Le chapitre 2 traite de la caractérisation des pathotypes de *Xam*. Au préalable, il était important de sélectionner une gamme de plantes hôte parmi la collection de manioc disponible au CIAT (Centre International d'Agriculture Tropicale, Cali, Colombie). Le choix des cultivars s'est basé à la fois sur l'analyse moléculaire (AFLP) et le niveau de résistance d'une centaine de cultivars de manioc. La gamme de plante hôte sélectionnée a été ensuite évaluée au champ dans deux ECZs différentes.

L'étude développée dans le chapitre 3 utilise les outils et les connaissances décrits dans les deux chapitres précédents. Nous analysons des populations de *Xam* au niveau microgéographique. Cette étude permet de mieux comprendre quels sont les facteurs qui peuvent induire des changements dans la structure des populations de *Xam*.

**2 DIVERSITE GENETIQUE DE *XANTHOMONAS*
AXONOPODIS PV. *MANIHOTIS***

2 DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *MANIHOTIS*

2.1 Introduction

Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches de *Xam*, croissance sur certains substrats carbonés, caractéristiques sérologiques, profils d'acides gras, résistance aux antibiotiques ont été les premiers estimateurs de la variabilité chez *Xam* (37, 61, 86, 141, 147). Récemment, les techniques moléculaires permettant d'évaluer la variabilité génétique de *Xam* ont été développées (12, 228, 229). Pour l'analyse de la structure des populations de *Xam*, la technique RFLP s'avère plus précise et discriminante que la caractérisation phénotypique (75, 225, 231).

La connaissance de la structure des populations de l'agent pathogène est un paramètre important pour développer une stratégie de lutte, notamment pour la sélection et l'introduction de cultivars résistants. Pour étudier la structure des populations de *X. a. pv. manihotis*, nous avons développé l'approche suivante. Les principales régions de culture du manioc ont été prospectées en 1996 (Figure 11). Une collection de souches a été constituée. Nous avons caractérisé ces souches, à l'aide des marqueurs moléculaires déjà disponibles pour l'étude de *Xam*. Nous avons analysé le polymorphisme de la longueur des fragments de restriction à l'aide de la sonde *pthB*, de deux sondes génomiques (pBS6 et pBS8) et de la sonde universelle 16S+23S d'*E. coli*. Nous avons également caractérisé les plasmides de *Xam*. Pour certaines populations de *Xam*, l'ensemble de ces marqueurs n'ont pas permis de différencier les souches de *Xam*. Nous avons donc développé un outil plus discriminant (AFLP) permettant de caractériser des populations génétiquement très homogènes. Le principe de cette technique est résumé dans la figure 10.

L'objectif est de sélectionner les souches de *Xam* qui seront utilisées dans l'étude des interactions souche x cultivar (chapitre 2) et pour la caractérisation des génotypes résistants.

2.2 Différenciation géographique des populations de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* en Colombie.

Geographical differentiation of the population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. Restrepo S. and Verdier V. 1997. Appl. Env. Microbiol. 63:4427-4434.

Geographical Differentiation of the Population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia

SILVIA RESTREPO¹ AND VALERIE VERDIER^{2*}

Cassava Program, Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia,¹ and Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM), Laboratoire de Phytopathologie Tropicale, 34032 Montpellier, France²

Received 20 March 1997/Accepted 2 September 1997

Analyses of DNA polymorphism and virulence variation were used to evaluate the population structure of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, the pathogen causing cassava bacterial blight in Colombia. We collected strains from the major cassava-growing regions which can be grouped into different edaphoclimatic zones (ECZs) according to environmental conditions, production constraints, and economic parameters. DNA polymorphism was assessed by a restriction fragment length polymorphism analysis, using an *X. axonopodis* pv. *manihotis* plasmid DNA sequence (*pthB*) as a probe to evaluate the genetic relatedness among 189 Colombian strains. The sampling intensity permitted the estimation of genetic differentiation within and among ECZs, sites, and fields and even within an individual plant. A multiple correspondence analysis indicated that the Colombian *X. axonopodis* pv. *manihotis* population showed a high degree of diversity relative to *X. axonopodis* pv. *manihotis* populations studied previously, and the entire collection was grouped into seven clusters. A general correlation was observed between the clusters and the geographical origin of the strains, as each cluster was largely composed of strains from the same ECZ. Representative strains, identified with *pthB*, were further characterized by ribotyping, hybridization to two repetitive genomic probes (pBS6 and pBS8), and restriction analysis of plasmid contents to evaluate the complementarity of these markers. Virulence variation was observed within the Colombian collection. Strains of different aggressiveness were found in all ecological zones, but no correlation between virulence variation and DNA polymorphism was observed. The genetic and virulence analyses contribute to understanding the *X. axonopodis* pv. *manihotis* population structure in Colombia.

Cassava bacterial blight (CBB) is a widespread and destructive disease that can cause important yield losses in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) (20). The causal agent is *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (37), which can induce a wide variety of symptoms, including angular leaf spots, blight, gum exudation, stem cankers, shoot wilt, vascular necrosis, and die-back (22, 25). In Colombia, the disease was first reported in 1971 (21, 22) and has since been reported in all of the cassava-growing regions within the country. The causal agent is frequently spread by the exchange of infected vegetative material. Losses are generally correlated with the number of infected cuttings used for planting (20). Root yield losses of 90% have been observed in fields of more than 100 ha in the Eastern Plains.

CBB is managed essentially through the use of resistant cultivars (20). Resistance to CBB has been developed from *M. esculenta* and the wild relative *M. glaziovii* and is thought to be polygenic and additively inherited (13). However, genetics of resistance to CBB have never been extensively studied in cassava, with the consequence no genes governing resistance have been documented for this crop. Information on the pathogen's population structure and geographic diversity is thus a prerequisite for studying the epidemiology of the disease and, subsequently, for selecting disease resistance sources for crop breeding (18). In other host-pathogen systems, the most widely used method for characterizing pathogen populations has been virulence analysis, using a set of differential cultivars of the host. However, pathotyping analysis does not always reflect the com-

plete genetic structure of a population because of dependence on the host genotypes used. The analysis of genetic variability through molecular markers can reveal the potential for change and the phylogenetic relationships within the population (20). Genetic diversity of plant pathogens has been assessed with different molecular techniques, such as restriction fragment length polymorphism (RFLP) (17), random amplified polymorphic DNA analysis (33), repetitive extragenic palindromic (REP) PCR fingerprinting (19), ribotyping (5), amplification of the rDNA spacer sequences (23), and the analysis of plasmid content (28). Recently, amplified fragment length polymorphism analysis has shown potential for use in epidemiological and evolutionary studies of bacteria (14).

In previous studies, the genetic diversity of *X. axonopodis* pv. *manihotis* was analyzed by using RFLP. This technique is precise and discriminatory in differentiating among *X. axonopodis* pv. *manihotis* strains (40). Results revealed that the African strains are homogeneous, whereas in South America the pathogen is highly diverse (40). This is to be expected, because the *Manihot* genus originates from South and Central America, where the centers of diversity are in Brazil and Mexico (29). Moreover, the introduction of the pathogen to Africa is relatively recent, and so it has not been subjected to selection pressure long enough to induce variability (25, 39), although recent RFLP analysis of African strains with a plasmid probe (*pthB*) did distinguish different haplotypes (4). The appearance of new RFLP types of *X. axonopodis* pv. *manihotis* in Africa may explain the observed breakdown of resistance in some improved cultivars (4). Mutations to increased virulence are considered to occur readily among *Xanthomonas* spp. (34). This may also explain why CBB occurred in epidemic proportions in Africa (4).

Until now, *X. axonopodis* pv. *manihotis* variability has not

* Corresponding author. Present address: Centro Internacional de Agricultura Tropical, A.A. 6713, Cali, Colombia. Phone: 57-2-4450037. Fax: 57-2-4450073. E-mail: v.verdier@cgnnet.com.

been studied extensively in South America. In the study presented here, *X. axonopodis* pv. *manihotis* genetic diversity was analyzed in the most important cassava-growing regions of Colombia, which span three different edaphoclimatic zones (ECZs 1, 2, and 5). The ECZs were defined according to the importance of the agroecosystem for cassava production, climatic conditions, predominant soil type, and pest and disease problems (9). Seven zones exist: ECZ 1 (subhumid tropics), ECZ 2 (acid-soil savannas), ECZ 3 (humid tropical lowlands), ECZ 4 (mid-altitude tropics), ECZ 5 (high-altitude tropics), ECZ 6 (subtropics), and ECZ 7 (semiarid areas).

This study aimed to assess the genetic diversity of *X. axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia by using RFLP assays, complemented with a survey of plasmid DNA and ribotyping. One major objective was to determine whether the diversity could be related to the broad spectrum of ecological conditions under which cassava is cultivated in this country. We also aimed to ascertain the extent of pathogenic variability of *X. axonopodis* pv. *manihotis* found in Colombia.

MATERIALS AND METHODS

***X. axonopodis* pv. *manihotis* isolates.** Table 1 lists, among others, 189 Colombian strains that were collected from different cassava varieties grown in 15 sites located throughout the three ECZs (Fig. 1). At each site, samples were collected from different fields, experimental fields (Villavicencio, Carimagua, Cajibío, and Pivijay) or farmer plantings. Stem or leaf samples were collected from various cassava plants within each field. The date and site of collection, the host variety and type of symptom from which bacteria were isolated were recorded in each case. One colony per sample was plated on YPG medium (composed of 5 g of yeast extract, 5 g of glucose, 5 g of Bacto Peptone, and 15 g of agar per liter). For long-term storage, bacteria were maintained in glycerol at -80°C . For the DNA extraction, the bacteria were grown overnight in a liquid medium containing peptone (10 g per liter), Casamino Acids (1 g per liter), and yeast extract (1 g per liter) (pH 7.2). Four strains collected in Brazil in 1995, two African strains collected in 1993, and 15 *X. axonopodis* pv. *manihotis* reference strains from six countries and which had been characterized previously (38) were also included in this study. With the 189 Colombian strains, a total of 210 strains were therefore studied (Table 1).

Genomic DNA analysis: extraction, digestion, and hybridization. Genomic DNA was extracted by the method of Boucher et al. (7), and concentration was estimated with a spectrophotometer. For each strain, 7 μg of total DNA was digested to completion with the enzyme *EcoRI* as described by the manufacturer (Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg, Md.). Digested DNA underwent electrophoresis in 0.7% agarose gels in TAE buffer (40 mM Tris-HCl-1 mM EDTA, adjusted to pH 7.6 with glacial acetic acid) at 45 V for 15 h. Fragments were visualized by UV radiation (302 nm) after staining agarose gels in ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$). A size standard (Raouli; Eurogentec, Liege, Belgium) was included in each gel. Fragments were transferred in alkaline solution onto a Hybond N^{+} membrane (Amersham) as specified by the manufacturer.

Probes. Membranes were hybridized with a plasmid probe, designated as *pthB* (previously named pF3), and two repetitive DNA elements, pBS6 and pBS8, previously characterized (40). Probe *pthB* is a 5.4-kb *EcoRI* fragment that was cloned from an indigenous plasmid and harbors a pathogenicity gene related to the *avr/pth* gene family (39). Probe *pthB* has shown homology to sequences in other *Xanthomonas* species (8, 40). The DNA probes were labeled with [α - ^{32}P]dATP by random priming (Multiprime; Amersham). Conditions of hybridization and washes were of high stringency. Filters were washed once with $2\times$ SSC ($1\times$ SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate)-0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) for 20 min, twice with $1\times$ SSC-0.1% SDS for 10 min, and once with $0.1\times$ SSC-0.1% SDS for 20 min. Blots were exposed on X-ray films (Kodak) at -80°C , with intensifying screens.

Ribotyping. Restriction digestion of total genomic DNA with the enzyme *EcoRI*, DNA blotting, and hybridization with an acetyl-amino fluoresce-labeled DNA probe, complementary to 16S-23S rRNA from *Escherichia coli*, were performed as previously described (5).

Plasmid extraction, restriction digests, and analysis. Plasmid DNA was extracted by the alkali lysis method described by Maniatis et al. (24). Extracted DNA was digested with the restriction enzyme *EcoRI* at 37°C for 5 h as recommended by the enzyme manufacturer (Gibco BRL). Plasmid DNA was subjected to agarose gel electrophoresis (0.7% agarose in TAE buffer, 6 h at 60 V). Restriction fragment sizes were estimated by using a 1-kb ladder (Gibco BRL) as a molecular size standard. DNA was transferred to nitrocellulose membrane and hybridized, using the *pthB* probe.

Pathogenicity tests. The pathogenicity of all strains was tested under greenhouse conditions at 28°C and 80% relative humidity on cassava plants of the susceptible variety MCOL 1522 grown from mature stem cuttings. Thirty days

after bud break, the immature stems were given stem puncture and leaf inoculations as previously described (40).

Stem puncture. Three plants (i.e., three replicates) per treatment were inoculated. Each treatment consisted of one strain (i.e., 210 treatments) which was inoculated into the plants by stem puncture receiving one single colony (about 10^8 CFU ml^{-1}). Symptoms were monitored at 7, 14, and 30 days after inoculation, with the observed reactions rated on the following scale: 0, healthy plant, no reaction observed; 1, dark area or necrosis around the inoculation point; 2, gum exudation on stem and petioles; 3, wilting of one or two leaves and exudation; 4, more than two leaves wilted; and 5, complete wilting and die-back. According to the disease reaction, virulence of strains was classified into three categories: 0 to 2.5 (avirulent), 2.5 to 3.5 (moderately virulent), and 3.5 to 5.0 (highly virulent).

Leaf inoculation. Leaves were inoculated as described by Verdier et al. (38). A calibrated inoculum of 10^8 was placed on a leaf hole. Eight holes per leaf and two leaves per plant were used. The average area of six lesions per strain was estimated 8 days after inoculation by scanning the lesions with a video system (35) and estimating the area with the software Sci-scan (11, 15). The leaf reaction was then assigned to one of five pathogenicity classes (A to E), which were determined by a descriptive method (univariate procedure of the SAS package) (30, 31).

Statistical analysis. Banding patterns of hybridization on autoradiograms obtained with the RFLP analysis using *pthB* (RFLP/*pthB* analysis) were used to compare the relatedness of strains. DNA of strains with different banding patterns or putatively different haplotypes underwent electrophoresis on the same gel to confirm band identities and differences. All experiments were done at least twice for each strain. Each band showing different electrophoretic mobility was assigned a position number after its size was determined in base pairs; the presence (coded 1) and absence (coded 0) of each fragment was recorded for each DNA sample. We recorded only clear bands, discarding weak bands from the analysis. A multiple-correspondence analysis was generated by use of the SAS option CORRESP (30, 31). Three dimensions of the analysis were used to determine the positions of the strains on a three-dimensional graph (2). The clustering criterion was the average linkage method, and the number of clusters was determined by consensus among the three principal clustering statistics: the cubic clustering criterion, pseudo F^2 , and pseudo t^2 (2) (SAS). Average genetic distances between and within clusters were calculated by the IML procedure of SAS (30, 31).

The diversity of *X. axonopodis* pv. *manihotis* strains from each ECZ in Colombia and for the entire Colombian collection was calculated by the equation $H = [n/(n-1)](1 - \sum X_i^2)$, where X_i is the proportion of the i th distinct *pthB* haplotype within a group (each ECZ or Colombia) and n is the number of strains in each group (26).

RESULTS

RFLP analysis with *pthB*. Each distinct RFLP banding pattern, obtained after hybridization with probe *pthB*, was regarded as a haplotype. Twenty-six haplotypes were defined among the Colombian strains collected in 1995 (Table 1 and Fig. 2). A total of 29 bands, ranging from 2.8 to 32 kb, were registered, and one to nine distinct bands were observed per strain. Thirteen haplotypes were each represented by a single strain, whereas other haplotypes (e.g., haplotype C4) were represented by as many as 42 strains (Table 1). Five reference strains showed haplotypes (haplotypes C2, C7, C12, C16, and C18) that had been recovered several years ago (Table 1). Some strains collected in 1995, and belonging to one of these haplotypes, were collected in the same ECZ as the strains previously collected. For example, CIAT 1202 isolated in 1981 from ECZ 5 belongs to a haplotype detected only in ECZ 5 during 1995. Of the other reference haplotypes of *X. axonopodis* pv. *manihotis* previously characterized (40), 10 were not found in the Colombian population collected in 1995 to 1996. The two African strains I47 and I208 showed haplotypes described in Colombia and Brazil, respectively (Table 1).

Genetic diversity as measured with *pthB*. The total genetic diversity of the *X. axonopodis* pv. *manihotis* collection, determined by RFLP/*pthB* analysis, was 0.88 (Table 2). ECZ 2 (acid-soil savannas) had the highest haplotypic diversity (0.78). Fifteen different haplotypes were detected among 86 strains analyzed (Table 2). The strains were isolated from four sites, and 11 of the 15 haplotypes were recovered from just one site (Villavicencio). In ECZ 1, genetic diversity was 0.75 (Table 2),

TABLE 1. *X. axonopodis* pv. *manihotis* strains used in this study

Strain ^a	Location	Source ^a	Yr of isolation	ECZ ^b	Haplotype ^c
Reference strains					
CIAT 1122	Colombia	CIAT	1974	2	C12
CIAT 1133	Colombia	CIAT	1974	1	C18
CIAT 1134	Colombia	CIAT	1975	1	C16
CIAT 1180	Colombia	CIAT	1977	2	C2
CIAT 1202	Colombia	CIAT	1981	5	C7
CFBP 1851	Colombia	CFBP	1974	1	11 ^d
ORST 211	Colombia	ORST	1992	1	28 ^d
NCPBP 2444	Colombia	NCPBP	1970	1	14 ^d
UPB070	Brazil	UPB	1941	2	10 ^d
NCPBP 1159	Brazil	NCPBP	1941	2	12 ^d
LMG779	Brazil	LMG	1978	2	4 ^d
CIAT 1135	Taiwan	CIAT	1975	6	13 ^d
ORSTX27	Togo	ORST	1989	7	1 ^d
ORST218	Sumatra	ORST	1992	3	S1
ORST 2	Venezuela	ORST	1971	1	8 ^d
Colombian field isolates					
CIO-1, -29	Colombia	FI	1995	2	C1
CIO-2, -3, -26, -31, -37, -39, -47, -133, -134, -164, -165	Colombia	FI	1995	2	C2
CIO-4	Colombia	FI	1995	2	C3
CIO-5, -27, -28, -30, -32, -34, -38, -41, -43, -45, -48-55, -117, -118, -120, -132, -137-139, -141, -142, -144-146, -150, -153, -154, -158-163, -166, -175, -177	Colombia	FI	1995	1 and 2	C4
CIO-81	Colombia	FI	1995	1	C5
CIO-89, -90, -91, -93, -106-109	Colombia	FI	1995	1	C6
CIO-11, -19	Colombia	FI	1995	5	C7
CIO-12, -13-18, -20, -21, -23, -112, -113, -178-181, -188, -189, -298-322	Colombia	FI	1995-96	5	C8
CIO-22	Colombia	FI	1995	5	C9
CIO-24	Colombia	FI	1995	1	C10
CIO-25	Colombia	FI	1995	1	C11
CIO-40, -122, -129, -135, -140, -143, -147-149, -169	Colombia	FI	1995	2	C12
CIO-46, -114, -115, -125, -127, -128, -131	Colombia	FI	1995	2	C13
CIO-56, -57, -59	Colombia	FI	1995	1	C14
CIO-58, -60, -62	Colombia	FI	1995	1	C15
CIO-61, -63-66, -94-96	Colombia	FI	1995	1	C16
CIO-136	Colombia	FI	1995	2	C17
CIO-67, -68-73, -80, -82-88, -92, -97-98, -100-105, -110	Colombia	FI	1995	1	C18
CIO-42, -116, -119, -123, -124, -126, -130, -155-157, -176	Colombia	FI	1995	2	C19
CIO-151	Colombia	FI	1995	2	C20
CIO-121	Colombia	FI	1995	2	C21
CIO-33	Colombia	FI	1995	2	C22
CIO-167	Colombia	FI	1995	2	C23
CIO-168	Colombia	FI	1995	2	C24
CIO-171	Colombia	FI	1995	2	C25
CIO-174	Colombia	FI	1995	2	C26
Field isolate from Brazil and Africa					
CIO-6	Brazil	FI	1995	2	B1
CIO-8	Brazil	FI	1995	1	B2
CIO-9	Brazil	FI	1995	2	B3
CIO-10	Brazil	FI	1995	2	B4
I47	Benin	IITA	1993	6	I1
I208	Nigeria	IITA	1993	6	B2

^a CIAT, *Xanthomonas* collection, Centro Internacional de Agricultura Tropical; CIO, CIAT-ORSTOM collection at CIAT, Cali, Colombia; I, IITA (collection of the International Institute of Tropical Agriculture, Cotonou, Benin); LMG, Gent culture collection, Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgium; NCPBP, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, United Kingdom; ORST, Collection of the Laboratoire de Phytopathologie, Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM), Montpellier, France; UPB, Unité de Phytopathologie Bactérienne, Louvain La Neuve, Belgium; FI, field isolate.

^b 1, subhumid tropics; 2, acid-soil savannas; 3, humid tropical lowlands; 5, high altitude tropics; 6, subtropics; 7, semiarid.

^c *pthB* haplotypes as described in the text.

^d Haplotypes as previously described (42).

with nine different haplotypes detected over nine sites. At La Coroza, haplotypic diversity was very high, with three haplotypes detected among five strains (Fig. 1). Two of these haplotypes, C15 and C16, were collected from two distinct symp-

toms on the same plant (leaf spots and blights). The haplotypic diversity was very low for ECZ 5 (0.13) (Table 2): 46 strains were collected in different fields and at different times in ECZ 5, but only three haplotypes were detected.

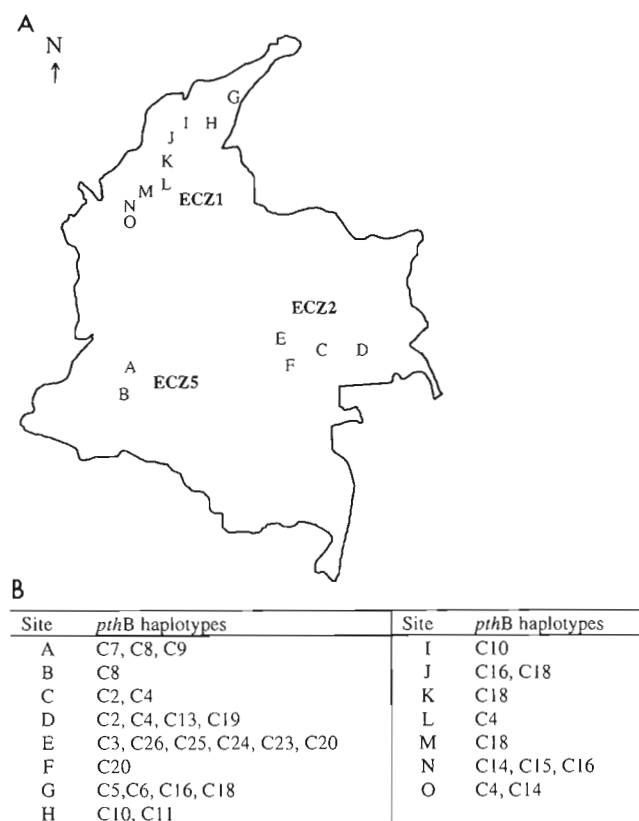


FIG. 1. (A) Geographical distribution of the haplotypes in Colombia. In each ECZ, strains were collected in different sites (A to O [B]). A, Cajibío; B, Mondomo; C, Puerto López; D, Carimagua; E, Villavicencio; F, Granada; G, Pivijay; H, María La Baja; I, Carmen de Bolívar; J, Sincelejo; K, Segovia; L, Ciénaga de Oro; M, Chinú; N, La Coroza; O, Finca el Canito.

Cluster analysis. Based on the multiple correspondence analyses, the 210 strains constituted seven clusters (Fig. 3). Three clusters contained monomorphic strains. Cluster 1 contained strains belonging to haplotype C12 (ECZ 2), including the reference strain CIAT 1122; cluster 4 consisted of strains belonging to haplotype C18 and the reference strain CIAT 1133, isolated in 1974; cluster 5 contained all haplotype C4 strains, the only haplotype detected in two different ECZs. Four clusters consisted of strains from a single ECZ: cluster 1 (ECZ 2), cluster 3 (ECZ 2), cluster 2 (ECZ 5), and cluster 4 (ECZ 1). Strains from ECZ 5, a region of high altitude, and the reference strain CIAT 1202, isolated in that region in 1981, formed a distinct cluster (cluster 2). Finally, clusters 6 and 7 contained the most diverse group of strains, with cluster 7 consisting of strains from five different ECZs: some Colombian strains from ECZ 1 and ECZ 2, and a reference strain from each of ECZ 3 (humid tropical lowlands), ECZ 6 (subtropics), and ECZ 7 (semiarid). Distances between and within clusters are shown in Table 3. The within-cluster distance of the cluster composed of ECZ 5 strains was low (0.07). The geographical origin of the different haplotypes in Colombia is shown in Fig. 1. In each ECZ, a different group of haplotypes was found, except for haplotype C4, which was described for ECZ 1 and ECZ 2, with a higher frequency in ECZ 2.

RFLP analysis with two repetitive probes. On the basis of the RFLP/*pthB* analysis presented above, 26 strains representing each of the different Colombian haplotypes defined were selected and examined for further characterization with two

repetitive probes (pBS6 and pBS8). Twenty-three repetitive patterns of DNA were observed among the 26 *pthB* haplotypes strains, using probe pBS6, and eight were defined by using probe pBS8 (Table 4). Hybridization profiles with the pBS8 probe were similar to those previously described (40), where two or three distinct bands were observed for most strains, but multiple bands were observed for another group of strains, e.g., strains collected in ECZ 5 (data not shown). All strains examined contained the pBS6 cloned sequence in high copy number. Banding patterns obtained with the two repetitive probes were not associated with the ECZs.

Ribotyping. Three distinct ribotypes (RNA 1, RNA 3, and RNA 5) were found among the 26 representative *X. axonopodis* pv. *manihotis* Colombian strains tested. Ribotype RNA 1 was detected among 13 strains collected in three ECZs. Ribotype RNA 5 consisted of eight strains from ECZ 1 and ECZ 2. The Brazilian strain CIO-9 was classified as RNA group 1, and Brazilian strain CIO-10 was classified as RNA group 2. No correlation was observed between the RNA group and the geographic origin (ECZ) of the Colombian strains. However, strains isolated in ECZ 5 were all classified in RNA group 1 (data not shown), whereas strains from ECZ 1 and ECZ 2 were placed in RNA groups 1, 3, and 5 (Table 4).

Plasmid analysis. The plasmid content analysis was performed on the set of 26 *X. axonopodis* pv. *manihotis* strains that represented the 26 *pthB* haplotypes found in Colombia. The digestion of the plasmid DNAs resulted in fragments with sizes ranging from 3 to 30 kb. Twenty-three plasmid patterns were observed after electrophoresis among the 26 strains (data not

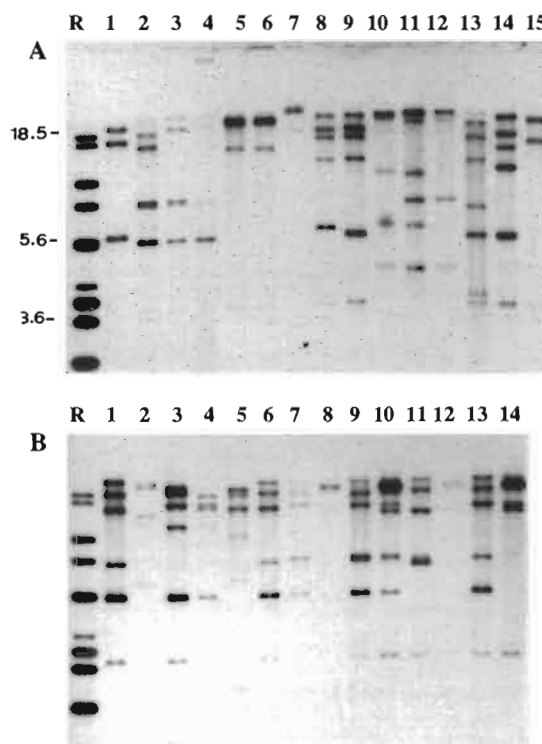


FIG. 2. Southern blot analysis of *EcoRI*-digested genomic DNA from *Xam* strains probed with α - 32 P-labeled *pthB*. The 26 haplotypes detected in Colombia are in the following order. (A) Lane 1, C1; lane 2, C2; lane 3, C17; lane 4, C3; lane 5 and 6, C4; lane 7, C22; lane 8, C5; lane 9, C6; lane 10, C7; lane 11, C8; lane 12, C9; lane 13, C10; lane 14, C11; lane 15, C12. (B) Lanes 1 and 6, C13; lane 2, C14; lane 3, C15; lane 4, C16; lane 5, C18; lanes 7 and 13, C19; lane 8, C20; lane 9, C21; lane 10, C23; lane 11, C24; lane 12, C25; lane 14, C26. Lanes R, Raoull size marker (in kilobases) (Eurogentec).

TABLE 2. Numbers of strains analyzed, *pthB* haplotypes, and patterns detected with two repetitive probes and with analysis of the plasmid content in each Colombian ECZ

ECZ or location	No. of collection sites	No. of strains analyzed	No. of <i>pthB</i> haplotypes	Genetic diversity among <i>pthB</i> haplotypes	No. of patterns detected with:		No. of patterns detected by analysis of plasmid content	
					pBS6	pBS8	Restriction	<i>pthB</i>
ECZ								
1	9	57	9	0.75	5	2	9	8
2	4	86	15	0.78	16	5	14	13
5	2	46	3	0.13	2	2	1	1
Colombia	15	189	26	0.88	23	8	23	21

shown). Strains that had the same profile had a common geographical origin: CIO-11, CIO-12, and CIO-22, from ECZ 5; and CIO-168 and CIO-171, from ECZ 2 (Table 4).

The blots obtained by DNA transfer were hybridized with probe *pthB*. The probe hybridized with two to six fragments per strain. Some strains showed a common profile: CIO-81 and CIO-90 (ECZ 1); CIO-11, CIO-12, and CIO-22 (ECZ 5); CIO-151 and CIO-121 (ECZ 2); and CIO-168 and CIO-174 (ECZ 2). No fragment was common to all of the studied strains. RFLP banding patterns of plasmids were similar to those obtained by using genomic DNA differing in one or two bands.

The restriction and RFLP analyses of the plasmid content were examined separately with a multiple-correspondence analysis. Seven clusters were formed in both analyses, and with few exceptions, the clusters contained a highly diverse group of strains isolated in different ECZs (data not shown).

Virulence analysis. Leaves were inoculated with the set of 26 Colombian strains. The control comprised leaves inoculated with sterile water; these did not show any visible reaction. The sizes of the water-soaked areas induced by the *X. axonopodis* pv. *manihotis* strains varied greatly. Strains were clustered into five pathogenicity classes as follows: (Table 4): 2 in group A (low aggressiveness), 5 in group B, 4 in group C, 13 in group D, and 2 in group E.

All of the *X. axonopodis* pv. *manihotis* Colombian strains except two (CIO-1 [haplotype C1 from ECZ 2] and CIO-188 [haplotype C12 from ECZ 5]) caused characteristic symptoms when inoculated by stem puncture on the susceptible cultivar MCOL 1522. Virulence variation was observed but did not usually correlate with geographical origin or with *pthB* clustering (Table 4). Variation was observed among and within haplotypes. However, for the 13 haplotypes that were represented by more than one strain, the variance of pathogenic diversity within each group was not significantly different (data not shown). In the three ECZs, strains presented identical distributions in all three categories of virulence (Fig. 4). No correlation was observed between the aggressiveness of the strains upon inoculation on stems or on leaves.

DISCUSSION

Based on DNA and pathogenic analyses and information on the geographical distribution of the pathogen's genetic groups, we can develop a picture of the CBB pathogen's population structure in Colombia. The genetic differentiation of the pathogen population was evaluated at three different levels: fields, sites, and ecozones.

RFLP/*pthB* analysis. The RFLP/*pthB* analysis was the most informative technique for assessing the genetic diversity of *X. axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. Results show that the Colombian *X. axonopodis* pv. *manihotis* population is highly

heterogeneous (the haplotypic diversity was 0.88), with 26 haplotypes detected among a collection of 189 strains. In Africa, only 14 genetic groups were described with similar techniques, for a collection containing more than 400 strains from different countries located in only two types of ECZ, acid-soil savannas (ECZ 2) and subtropics (ECZ 6) (4). The high degree of genetic variability in Colombia may result from the broad range of conditions under which cassava is cultivated and thus from the diversity of host genotypes. This may be the case in some experimental cassava fields in ECZ 2 and ECZ 1 where germ plasm evaluations are being conducted on a significant diversity of accessions. Strains were isolated from 62 different cassava varieties in ECZ 2 and from 23 varieties in ECZ 1. High levels of genetic diversity may also be a consequence of the longer history of cassava cultivation in South America, which is the crop's center of origin. A further factor of diversity is the introduction of strains with experimental material (6, 20).

The cluster analysis based on the *pthB* haplotypic composition of the entire collection reflected the distribution of strains among the ecozones. In fact, distinguishing different geographical groups was possible because each ECZ, with one exception (C4), contained its own set of haplotypes. The RFLP/*pthB*

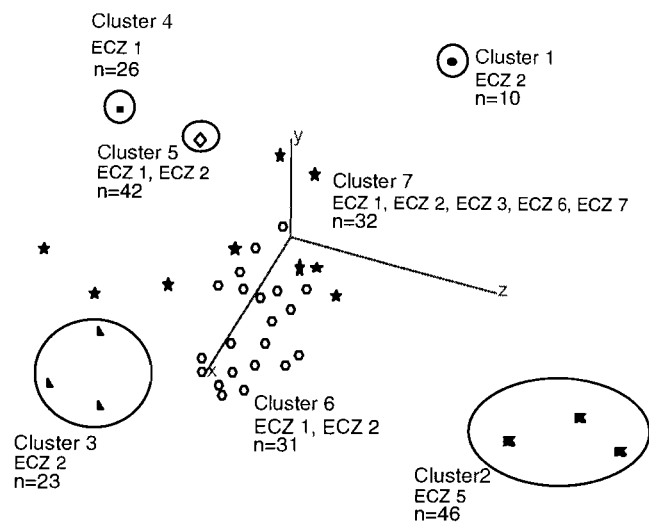


FIG. 3. Three-dimensional graph from a multiple-correspondence analysis, showing the relationships of *X. axonopodis* pv. *manihotis* haplotypes after RFLP/*pthB* analysis. The number of clusters that best fit the data was determined by the consensus of three clustering statistics: pseudo F^2 , pseudo t^2 , and cubic clustering criterion. The ECZs of strains contained in each cluster and the number (n) of strains of each cluster are indicated. Symbols denotes cluster members.

TABLE 3. Mean genetic distances between and within the seven clusters generated by the multiple correspondence analysis of 210 *X. axonopodis* pv. *manihotis* strains analyzed with a *pthB* probe

Cluster	Mean genetic distance						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0						
2	1	0.07					
3	0.67	0.87	0.14				
4	1	0.91	0.91	0			
5	0.80	1	0.89	0.88	0		
6	0.86	0.92	0.79	0.94	0.94	0.70	
7	0.80	0.94	0.65	0.81	0.70	0.83	0.50

analysis can thus be used to distinguish the Colombian subpopulations of the pathogen. Previous reports of genetic variability among South American *X. axonopodis* pv. *manihotis* strains (39) indicate that a high degree of pathogen diversity also exists in other South American countries such as Venezuela and Brazil.

The group of strains from ECZ 5 showed a clonal structure (haplotypic diversity = 0.13; within-cluster distance = 0.07). The existence of clonal populations within a country may be caused by geographic barriers (1, 2) and the similarity of cassava varieties cultivated in the region. ECZ 5 fulfills these characteristics: it is located in the mountainous Andean zone (a geographic barrier), where only a few cassava varieties are

TABLE 4. Selected strains of the *X. axonopodis* pv. *manihotis* population in Colombia tested by RFLP/*pthB* analyses, using two genomic probes (pBS6 and pBS8) and a restriction endonuclease digestion of plasmid content for one strain per *pthB* group

<i>pthB</i> representative strain	<i>pthB</i> haplotype	Banding pattern			Ribotypes ^a	Pathogenicity ^b	
		pBS6	pBS8	Plasmids		Stem	Leaf
CIO-1	C1	1	1	1	3	1.7	A
CIO-37	C2	2	2	2	1	4	B
CIO-4	C3	3	2	3	ND	3	B
CIO-5	C4	4	3	4	1	5	B
CIO-81	C5	5	2	5	1	4.3	C
CIO-90	C6	5	2	6	1	4	A
CIO-11	C7	6	4	7	1	5	D
CIO-12	C8	7	4	7	1	4.3	C
CIO-22	C9	7	5	7	1	5	C
CIO-24	C10	8	6	8	5	4.7	E
CIO-25	C11	9	2	9	5	3	D
CIO-40	C12	10	7	10	1	3.7	D
CIO-46	C13	11	2	11	5	5	B
CIO-59	C14	12	2	12	1	5	D
CIO-62	C15	5	2	13	1	5	D
CIO-64	C16	13	2	14	1	5	D
CIO-136	C17	14	2	15	5	5	D
CIO-84	C18	15	2	16	5	3	D
CIO-119	C19	16	2	17	5	5	B
CIO-151	C20	17	2	18	ND	4.3	D
CIO-121	C21	18	3	19	1	3.7	C
CIO-33	C22	19	8	20	ND	3.7	D
CIO-167	C23	20	2	21	5	5	D
CIO-168	C24	21	3	22	ND	4.3	E
CIO-171	C25	22	2	22	5	5	D
CIO-174	C26	23	3	23	1	5	D

^a ND, not determined.

^b For stems, on a scale of 0 to 5 where 1 = healthy plant and 5 = complete wilting. For leaves, on a scale of A to E where A = low aggressiveness and E = high aggressiveness.

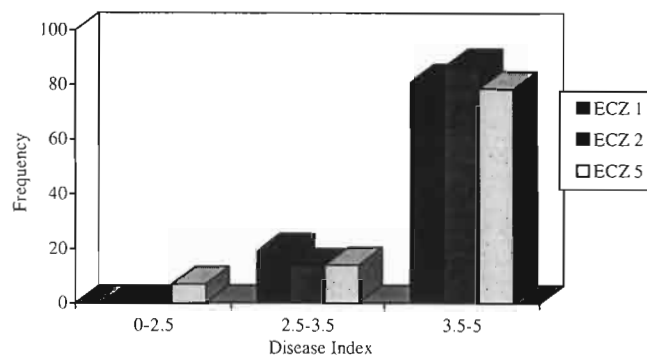


FIG. 4. Frequency (percentage of strains per ECZ) of distribution and pathogenic structure of the Colombian *X. axonopodis* pv. *manihotis* population in the three ECZs. Disease reaction was evaluated by stem inoculation of cassava cultivar MCOL 1522 on a scale of 0 to 5 (results are the average of three plants).

grown, thus representing a limited genetic base as a result of local preferences and production constraints (13a). Homogeneity within the host population reflected on the pathogen. A clonal structure can be detected with a probe that contains a pathogenicity gene, like *pthB*, as was demonstrated for some pathovars of *Xanthomonas* (32, 39).

Among the haplotypes recovered several years ago, haplotype C7 is particularly interesting. Strain CIAT 1202 (haplotype C7) was collected 15 years ago in ECZ 5 from Santander de Quilichao, and strains of the same haplotype were later (in 1995) collected in Cajibío, where cassava was only recently introduced. This finding suggests that haplotype C7 probably was propagated from Santander de Quilichao to Cajibío (ECZ 5) through contaminated vegetative material. The exchange of planting material is important within the various ECZs, and fields which are free of CBB may become infected with strains common to other sites.

The *pthB* probe is carried on a plasmid that is widely distributed among *X. axonopodis* pv. *manihotis* strains. Plasmid conjugation has not been reported for *X. axonopodis* pv. *manihotis*. However the conjugative transfer of plasmids is an important way of facilitating genetic exchange between bacteria (10). The restricted exchange of plasmids between strains of a pathogen due to geographical barriers or host selection determines the structure of the population, at least for the plasmid-borne information detected by *pthB*-like probes. The differential variation in plasmid profiles for a host-locality combination may contribute to the existence of ecotypes. This may be the case of ECZ 5, where the pathogen is found in a particular host-locality combination (see above). Consequently, the ECZ 5 population formed a robust cluster apart from the other clusters regardless of the technique used.

RFLP with two repetitive probes and plasmid content analysis. No additional information was obtained with the other RFLP analysis or with the analysis of plasmid content. Even so, by hybridizing the genomic DNA with the *pthB* probe and comparing the autoradiograms with those obtained with the plasmid DNA, the numbers of hybridizing fragments in the *X. axonopodis* pv. *manihotis* chromosome can be determined. In most cases, more than two *pthB* sequences appear to exist in the chromosome. Coplin (10) suggested that plasmids and their hosts' chromosomes have coevolved to constitute a balanced genome. A test for this hypothesis would be to see if RFLP analyses based on genomic and plasmid DNA reveal similar phylogenetic relationships (28). In our study, RFLP clusterings were very similar in analyses using genomic or plas-

mid DNA, supporting the hypothesis of coevolution between plasmid and chromosomal genomes.

Ribotyping. Ribotyping has been suggested as a rapid way of comparing the genetic relationships among different bacteria (12) and has been useful for studying the epidemiology of the pathogen on a large geographical scale (40). Based on this analysis, Verdier et al. (40) showed a correlation between ribotypes and geographical origin. Only ribotype 1 was detected within the African strains. The South American strains showed the five possible patterns described for *X. axonopodis* pv. *manihotis* strains (39). Colombian strains isolated in 1995 showed three patterns, RNA groups 1, 3, and 5 (Table 4).

The hypothesis that the CBB pathogen was introduced to Africa from South America was proposed by Terry et al. in 1979 (36) and supported by Maraite et al. in 1981 (25). Recent reports also have shown results consistent with this hypothesis (5, 39). In the present study, the two African strains showed haplotypes detected in Colombia and Brazil, indicating the possibility of their introduction from one or both South American countries.

The geographical distribution of virulence variation must be known if strategies are to be successful against the most virulent strains in a region or against groups of strains showing similar pathogenic behaviors. In the present study, virulence variation was studied in terms of stem reactions on a susceptible cultivar to all strains and in terms of leaf reactions to a selected group of strains. Results showed that the *X. axonopodis* pv. *manihotis* strains isolated in the three ECZs in Colombia are highly virulent, the majority causing complete wilting of the plant when inoculated on stems. On the 0 to 5 scale, stem reactions varied between 3 and 5, except for CIO-1 and CIO-188. No correlation with geographical origin of strains was observed. No variation in mesophyll colonization was observed in either susceptible or resistant cultivars, suggesting that defense genes express themselves in vascular tissues (16). This may have caused the lack of correlation between stem and leaf inoculations.

In this study, virulence data were not clearly linked to haplotype groups. However, only one cassava cultivar was used. We will therefore investigate the existence of differential interactions between strains and cassava cultivars, using the results of the genetic analysis presented here. For this, a strategy could be the one proposed by Nelson et al. (27), which used one strain per RFLP group to inoculate a set of varieties. If the existence of pathotypes is demonstrated, then knowing the *X. axonopodis* pv. *manihotis* pathogenic structure, linked with genetic analyses, will help us to identify ecosystem-specific pathogen populations (3). These populations then can become the targets of resistant genotypes (17). More information also must be obtained about pathogen genetic variation over time before the deployment of resistance against any possible ecotype of the pathogen can be suggested.

Collectively, the results presented gave an insight into the Colombian *X. axonopodis* pv. *manihotis* population structure. The pathogen showed high levels of diversity and geographical differentiation. Different haplotypes were detected in each ECZ. This differentiation will be useful for evaluating germplasm with a specific set of *X. axonopodis* pv. *manihotis* strains that represents the range of genetic diversity.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Bonierbale for valuable comments on the first draft of the manuscript and for stimulating discussions. We are grateful to S. Kelemu, C. Iglesias, and M. Levy for critically reading the manuscript and E. de Paez for editing review. We gratefully acknowledge W. Roca and E. Alvarez for their support. We thank D. Z. Skinner (Kansas

State University) and M. Duque (CIAT Biometry Unit) for statistical consultations. We also thank the staff of the CIAT's experiment stations for their help during sampling.

This research was supported by grants from ORSTOM and CIAT and by a doctoral fellowship awarded to S. Restrepo by ORSTOM.

REFERENCES

- Adhikari, T. B. 1994. Phenotypic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Nepal. *Plant Dis.* 78:68-72.
- Adhikari, T. B., C. M. Vera Cruz, Q. Zhang, R. J. Nelson, D. Z. Skinner, T. W. Mew, and J. E. Leach. 1995. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:966-971.
- Ardales, E. Y., H. Leung, C. M. Vera Cruz, T. W. Mew, J. E. Leach, and R. J. Nelson. 1996. Hierarchical analysis of spatial variation of the rice bacterial blight pathogen across diverse agroecosystems in the Philippines. *Phytopathology* 86:241-252.
- Assigbetsé, K., V. Verdier, K. Wydra, K. Rudolph, and J. P. Geiger. 1996. Genetic variation of the cassava bacterial blight pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* originating from different ecoregions in Africa, p. 37. In R. Balasubramanian, D. Lalithakumari, and A. Mahadevan (ed.), Abstracts of the 9th International Congress of Plant Pathogenic Bacteria. University of Madras, Madras, India.
- Berthier, Y., V. Verdier, J. L. Guesdon, D. Chevrier, J. B. Denis, G. Decoux, and M. Lemattre. 1993. Characterization of *Xanthomonas campestris* pathovars by rRNA gene restriction patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:851-859.
- Boher, B., and V. Verdier. 1995. Cassava bacterial blight in Africa. The state of knowledge and implications for designing control strategies. *Afr. Crop Sci. J.* 2:1-5.
- Boucher, C., P. Barberis, A. Trigalet, and D. Demery. 1985. Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: isolation of Tn5-induced avirulent mutants. *J. Gen. Microbiol.* 131:2449-2457.
- Bragard, C., V. Verdier, and H. Maraite. 1995. Genetic diversity among *Xanthomonas campestris* strains pathogenic to small grains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1020-1026.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1988. Annual report 1987. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.
- Coplin, D. L. 1989. Plasmids and their role in evolution of plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27:187-212.
- Delta-T SCAN Devices, Ltd. 1993. Delta-T SCAN software, version 2.0. Delta-T Devices, Cambridge, England.
- Grimont, F., D. Chevrier, P. A. D. Grimont, M. Lefevre, and J. L. Guesdon. 1989. Acetylaminofluorene-labeled ribosomal RNA for use in molecular epidemiology and taxonomy. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 140:447-454.
- Hahn, S. K. 1978. Breeding of cassava for resistance to cassava mosaic disease and bacterial blight in Africa, p. 211-219. In H. Maraite and Y. A. Meyer (ed.), Diseases of tropical food crops. Proceedings of the International Symposium at Université Catholique de Louvain, Louvain La Neuve, Belgium. Université Catholique de Louvain, Louvain La Neuve, Belgium.
- Iglesias, C. Personal communication.
- Janssen, P., R. Coopman, B. Huys, J. Swings, M. Bleeker, P. Vos, M. Zabeau, and K. Kersters. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool to bacterial taxonomy. *Microbiology* 142:1881-1893.
- Kirchhof, G., and K. Pendar. 1993. In N. Webb (ed.), Delta-T SCAN user's guide. Delta-T Devices, Cambridge, England.
- Kpémoua, K., B. Boher, M. Nicole, P. Calatayud, and J. P. Geiger. 1996. Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Can. J. Microbiol.* 42:1131-1143.
- Leach, J. E., M. L. Rhoads, C. M. Vera Cruz, F. F. White, T. W. Mew, and H. Leung. 1992. Assessment of genetic diversity and population structure of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* with a repetitive DNA element. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2188-2195.
- Leung, H., R. J. Nelson, and J. E. Leach. 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *Adv. Plant Pathol.* 10:157-205.
- Louws, F. J., D. W. Fulbright, C. Taylor Stephens, and F. J. de Bruijn. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85:528-536.
- Lozano, J. C. 1986. Cassava bacterial blight: a manageable disease. *Plant Dis.* 70:1089-1093.
- Lozano, J. C., and L. Sequeira. 1974. Bacterial blight of cassava in Colombia: epidemiology and control. *Phytopathology* 64:83-88.
- Lozano, J. C., and L. Sequeira. 1974. Bacterial blight of cassava in Colombia: etiology. *Phytopathology* 64:74-82.
- Maes, M., P. Garbeva, and O. Kamoen. 1996. Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leaf streak using rDNA spacer sequences and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86:63-69.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Maraite, H., J. Weyns, O. Yimkwan, P. Lipembra, and D. Perreux. 1981. Physiological and pathogenic variations in *Xanthomonas campestris* pv. *mani-*

- hotis*, p. 358–368. In J. C. Lozano and P. Gwin (ed.), Plant pathogenic bacteria. Proceedings of the 5th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. CIAT, Cali, Colombia.
26. **Nei, M., and F. Tajima.** 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* **97**:145–163.
 27. **Nelson, R. J., M. R. Baraoidan, C. M. Vera-Cruz, I. V. Yap, J. E. Leach, T. W. Mew, and H. Leung.** 1994. Relationship between phylogeny and pathotype for the bacterial blight pathogen of rice. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3275–3283.
 28. **Pruvost, O., J. S. Hartung, E. L. Civerolo, C. Dubois, and X. Perrier.** 1992. Plasmid DNA fingerprints distinguish pathotypes of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, the causal agent of citrus bacterial canker disease. *Phytopathology* **82**:485–490.
 29. **Rogers, D. J., and S. G. Appan.** 1973. Flora Neotropica monograph no. 13. *Manihot manihotoides* (Euphorbiaceae). Hafner Press, New York, N.Y.
 30. **SAS Institute, Inc.** 1989. SAS/IML software: usage and reference, version 6, 1st ed. SAS Institute, Inc., Cary, N.C.
 31. **SAS Institute, Inc.** 1989. SAS/STAT user's guide, 4th ed., vol. 1. SAS Institute, Inc., Cary, N.C.
 32. **Selander, R. K., R. M. McKinney, T. S. Whittam, W. F. Bibb, D. J. Brenner, F. S. Nolte, and P. E. Pattison.** 1985. Genetic structure of population of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* **163**:1021–1037.
 33. **Smith, J. J., J. S. Scott-Craig, J. R. Leadbetter, G. L. Bush, D. L. Roberts, and D. W. Fulbright.** 1994. Characterization of random amplified polymorphic DNA (RAPD) products from *Xanthomonas campestris* and some comments on the use of RAPD products in phylogenetics analysis. *Mol. Phylogenet. Evol.* **3**:135–145.
 34. **Stolp, H., M. P. Starr, and N. L. Baigent.** 1965. Problems in speciation of phytopathogenic Pseudomonads and Xanthomonads. *Annu. Rev. Phytopathol.* **3**:231–264.
 35. **Stratagene, Inc.** EagleEye II still video system. Stratagene, Inc., La Jolla, Calif.
 36. **Terry, E. R., G. J. Persley, and S. C. A. Cook.** 1979. Cassava bacterial blight in Africa. Center for Overseas Pest Research, London, England.
 37. **Vauterin, L., B. Hoste, K. Kersters, and J. Swings.** 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. Syst. Bacteriol.* **45**:472–489.
 38. **Verdier, V., G. Cuny, K. Assigbétsé, J. P. Geiger, and C. Boucher.** 1996. Characterization of pathogenicity gene *pthB* in *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, abstr. 671. In G. Stacey, B. Mullin, and P. Gresshoff (ed.), Proceedings of the 8th International Congress on Plant-Microbe Interactions. International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul, Minn.
 39. **Verdier, V., P. Dongo, and B. Boher.** 1993. Assessment of genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *J. Gen. Microbiol.* **139**:2591–2601.
 40. **Verdier, V., B. Boher, H. Maraite, and J. P. Geiger.** 1994. Pathological and molecular characterization of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of cassava (*Manihot esculenta*). *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:4478–4486.

ERRATA

Geographical Differentiation of the Population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia

SILVIA RESTREPO AND VALERIE VERDIER

Cassava Program, Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, and Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM), Laboratoire de Phytopathologie Tropicale, 34032 Montpellier, France

Volume 63, no. 11, p. 4430, Figure 1: panel B should appear as shown below.

Site	<i>pthB</i> haplotypes	Site	<i>pthB</i> haplotypes
A	C7, C8, C9	I	C10
B	C8	J	C16
C	C2, C4	K	C18
D	C1, C2, C4, C12, C13; C19, C21, C22	L	C4
E	C2, C3, C4, C12, C13, C19, C20, C23, C24, C25, C26	M	C18
F	C4, C12, C17, C20	N	C14, C15, C16
G	C5, C6, C16, C18	O	C4, C14
H	C10, C11		

2.3 AFLP: une technique efficace pour la détection de la diversité génétique de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. Restrepo S., Duque, M.C., Verdier V. and Tohme J. 1998. Microbiology 145: 107-114.

AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

Silvia Restrepo,¹ Myriam Duque,¹ Joe Tohme¹ and Valérie Verdier^{1,2}

Author for correspondence: Valérie Verdier. Tel: +57 2 4450037. Fax: +57 2 4450073.
e-mail: v.verdier@cgnnet.com

¹ Biotechnology Unit, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), AA 6713, Cali, Colombia

² Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM), Genetrop, Unité de Phytopathologie, BP5045, 34032 Montpellier, France

***Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) is the causative agent of cassava bacterial blight (CBB), a worldwide disease that is particularly destructive in South America and Africa. CBB is controlled essentially through the use of resistant varieties. To develop an appropriate disease management strategy, the genetic diversity of the pathogen's populations must be assessed. Until now, the genetic diversity of *Xam* was characterized by RFLP analyses using ribotyping, and plasmid and genomic *Xam* probes. We used AFLP (amplified fragment length polymorphism), a novel PCR-based technique, to characterize the genetic diversity of Colombian *Xam* isolates. Six *Xam* strains were tested with 65 AFLP primer combinations to identify the best selective primers. Eight primer combinations were selected according to their reproducibility, number of polymorphic bands and polymorphism detected between *Xam* strains. Forty-seven *Xam* strains, originating from different Colombian ecozones, were analysed with the selected combinations. Results obtained with AFLP are consistent with those obtained with RFLP, using plasmid DNA as a probe. Some primer combinations differentiated *Xam* strains that were not distinguished by RFLP analyses, thus AFLP fingerprinting allowed a better definition of the genetic relationships between *Xam* strains.**

Keywords: AFLP, DNA fingerprinting, genetic diversity, pathogen population study

INTRODUCTION

Xanthomonas axonopodis pv. *manihotis* (*Xam*) is the causal agent of cassava bacterial blight (CBB), a particularly destructive disease of cassava in South America and Africa. Under favourable conditions, yield losses can reach 80% after three cycles of vegetative propagation (Lozano, 1986). Furthermore, CBB has caused more damage to the crop than any other cassava disease (Lozano, 1986). The use of resistant cultivars is the principal means of control (Lozano, 1986), but effective breeding for resistance depends on information on the diversity and genetic structure of pathogen populations. Because of the broad range of conditions under which cassava is cultivated, the cassava production regions were divided into edaphoclimatic zones (ECZs). These were defined according to the importance

of the agro-ecosystem for cassava production, climatic conditions, predominant soil type, and pest and disease problems. Seven zones exist: ECZ1, subhumid tropics; ECZ2, acid-soil savannas; ECZ3, humid tropical lowlands; ECZ4, mid-altitude tropics; ECZ5, high-altitude tropics; ECZ6, subtropics; ECZ7, semi-arid tropics.

To assess the genetic diversity of *Xanthomonas* pathogens, the following techniques have been used extensively: RFLP, for the study of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Leach *et al.*, 1992); random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Smith *et al.*, 1994) and ribotyping (Berthier *et al.*, 1993) to study diversity among different pathovars of *Xanthomonas campestris*; rep-PCR fingerprinting for the characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Louws *et al.*, 1995); and polymorphism of amplification of rDNA spacer sequences to determine the relatedness between *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leaf streak (Maes *et al.*, 1996).

Until recently, the genetic diversity of *Xam* was mainly characterized by RFLP analyses, using the pathogenicity gene (*pthB*) as the RFLP probe (Restrepo & Verdier,

Abbreviations: AFLP, amplified fragment length polymorphism; CBB, cassava bacterial blight; ECZ, edaphoclimatic zone; Hd, genetic diversity index; MCA, multiple correspondence analysis; *Xam*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*.

1997; Verdier *et al.*, 1993). This technique is more precise and discriminative than those of RFLP analyses using genomic probes (pBS6 and pBS8) or ribotyping (Restrepo & Verdier, 1997; Verdier *et al.*, 1993). The genetic variability of *Xam* was pronounced in strains from South America but was limited in strains from other regions (Verdier *et al.*, 1993). The analysis of Colombian *Xam* populations, collected from different ecological zones, showed the existence of at least one clonal population (Restrepo & Verdier, 1997), which was found in the high-altitude tropics. To verify the genetic homogeneity of this population, we needed a molecular technique that can detect smaller sequence variations than can the RFLP technique. Moreover, the sequences with which the pathogenicity gene (*pthB*) hybridizes have the major disadvantage of representing a minute portion of the genome, containing genes that are subject to strong natural selection (Leung *et al.*, 1993). To avoid possible bias, the population structure should be inferred from neutral markers that distribute randomly throughout the genome (Janssen & Dijkshoorn, 1996).

Amplified restriction fragment length polymorphism (AFLP) is a recently developed technique for the fingerprinting of plant, bacterial, fungal and nematode genomes (Folkerstma *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1996; O'Neill *et al.*, 1997; Vos *et al.*, 1995). The advantages (Dijkshoorn *et al.*, 1996; Janssen *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1996) of this technique in characterizing microbial populations are the extensive coverage of the genome under study (Janssen *et al.*, 1996) and that the complexity of the AFLP fingerprint can be advantageously managed by adding selective bases to the primers during PCR amplifications (Vos *et al.*, 1995). For the bacterial genome, the AFLP method has been evaluated in microbial taxonomy (Vaneechoutte, 1996), in diversity studies of human pathogenic bacteria (Huys *et al.*, 1996; Picardeau *et al.*, 1997), and in characterizing plant-pathogenic bacteria at the pathovar level (Bragard *et al.*, 1997). Janssen *et al.* (1996) also demonstrated the high resolution of AFLP in characterizing bacterial strains at the subgeneric level. However, until now, AFLP has not been applied to population studies of plant-pathogenic bacteria at the pathovar level.

The objective of this study was to ascertain the usefulness of the AFLP technique in assessing the genetic diversity of *Xam* at the infrapathovar level. We aimed to establish the appropriate conditions for applying the technique to the study of a *Xam* population.

METHODS

Bacterial strains and DNA isolation. We used 46 field isolates collected in Colombia in 1995 and 1996 and one reference strain, CIAT1121 (Table 1). The geographical origin, year of collection, ECZ from where strains were isolated and haplotype for each *Xam* strain are described in Table 1. Strains were grown on YPG medium, composed of 5 g yeast extract l⁻¹; 5 g glucose l⁻¹; 5 g bacto peptone l⁻¹; 15 g agar l⁻¹. For DNA extraction, the bacteria were grown overnight on a rotary shaker in medium containing peptone (10 g l⁻¹), casamino

acids (1 g l⁻¹) and yeast extract (1 g l⁻¹) at pH 7.2. Genomic DNA was extracted by the method of Boucher *et al.* (1985).

AFLP reactions. AFLP markers were assayed as previously described by Vos *et al.* (1995), with the following modifications: 500 ng DNA was digested in 50 µl with four combinations of enzymes (*EcoRI/MseI*, *EcoRI/TaqI*, *PstI/MseI* and *PstI/TaqI*), then ligated to the respective adapters. Five microlitres of the ligation reaction was amplified for 35 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 60 s. The PCR product was diluted 20-fold and 5 µl of the dilution was used for the second amplification, using the same primers as in the first amplification. This PCR reaction was performed with the touch-down PCR thermal profile, with the initial annealing temperature of 60 °C and subsequent reduction by 1 °C per cycle to 55 °C. The remaining 30 cycles were as described for the first amplification. Amplifications were done at least twice for each strain.

After completing the second amplification, 3 µl Stop Solution (Pharmacia Biotech) was added to 5 µl reaction mixture. Mixtures were heated for 3 min at 95 °C and chilled on ice. Four microlitres of each mixture was loaded onto the gel. The amplified products were separated on a 6% polyacrylamide denaturing gel on a Sequi-Gen (Bio-Rad) sequencing apparatus. Electrophoresis was carried out for 90 min for the *EcoRI/TaqI* primer combination and 2 h for the other combinations in 1× TBE buffer (100 mM Tris, 100 mM boric acid, 2 mM EDTA) at 40 V cm⁻¹ and 45 °C. Gels were covered with Saran Wrap, transferred to Whatman 3 MM chromatography paper, dried under vacuum for 1 h at 80 °C and exposed to X-ray film for 16 h.

The number and nature of selective nucleotides can modify the complexity of the fingerprint. To identify the best selective primers, tests were conducted on six *Xam* strains (CIO-1, CIO-46, CIO-90, CIO-298, CIO-299, and CIO-300) with 64 primer combinations, using all 16 possible combinations of +1/+1 primer combinations for each pair of enzymes and an additional combination, *PstI*+GG/*MseI*+G. These strains were collected in ECZs 1, 2 and 5, and belong to different RFLP-*pthB* haplotypes. The entire set of 47 strains (Table 1) was then analysed, using the eight selected combinations of primers.

The reproducibility of AFLP was assessed by comparing the fingerprint obtained from duplicate assays of six strains based on all primer combinations. Duplicate AFLP fingerprints were produced using two aliquots of one AFLP-PCR reaction that was run in different gels. A molecular mass standard (a p 30 330 bp DNA Ladder, Gibco Life Technologies) was used to determine band size.

Data analysis. AFLP markers were used from eight primer combinations and were scored as either present (1) or absent (0). Only strong bands were scored, faint bands were discarded. We used *ntsys -pc* (version 1.80; Rohlf, 1994) to calculate a similarity matrix, using Jaccard's coefficient of similarity. Cluster analysis was done with the unweighted pair group arithmetic mean method in the SAHN program of *ntsys -pc*. A dendrogram was constructed with the TREE option. A correlation index was calculated between the similarity matrices resulting from AFLP and RFLP, using the *pthB* probe (Restrepo & Verdier, 1997) to determine the complementarity or redundancy of results. Correlation of RFLP and AFLP was determined by the *ntsys -pc* option MXCOMP. A multiple correspondence analysis (MCA) was also generated, using the SAS option CORRESP (SAS, version 6, 1989) to assess the relationships among strains and to evaluate the contribution of AFLP products to the variation observed among strains. The number of clusters generated by

Table 1. *Xam* strains used in this study

Strain*	Colombian department	Location	Year of isolation	ECZ	Haplotype
CIAT 1121	Cauca	Mondomo	1974	5	C8
CIO-1	Meta	Carimagua	1995	2	C1
CIO-37	Meta	Carimagua	1995	2	C2
CIO-4	Meta	Villavicencio	1995	2	C3
CIO-5	Meta	Villavicencio	1995	2	C4
CIO-81	Magdalena	Pivijay	1995	1	C5
CIO-90	Magdalena	Pivijay	1995	1	C6
CIO-11	Cauca	Cajibío	1995	5	C7
CIO-12	Cauca	Cajibío	1995	5	C8
CIO-22	Cauca	Cajibío	1995	5	C9
CIO-24	Bolívar	María La Baja	1995	1	C10
CIO-25	Bolívar	María La Baja	1995	1	C11
CIO-40	Meta	Villavicencio	1995	2	C12
CIO-46	Meta	Villavicencio	1995	2	C13
CIO-59	Córdoba	La Corosa	1995	1	C14
CIO-62	Córdoba	La Corosa	1995	1	C15
CIO-64	Sucre	Sincelejo	1995	1	C16
CIO-136	Meta	Granada	1995	2	C17
CIO-84	Magdalena	Pivijay	1995	1	C18
CIO-119	Meta	Carimagua	1995	2	C19
CIO-151	Meta	Granada	1995	2	C20
CIO-121	Meta	Carimagua	1995	2	C21
CIO-33	Meta	Carimagua	1995	2	C22
CIO-167	Meta	Villavicencio	1995	2	C23
CIO-168	Meta	Villavicencio	1995	2	C24
CIO-171	Meta	Villavicencio	1995	2	C25
CIO-174	Meta	Villavicencio	1995	2	C26
CIO-298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 306, 307, 309	Cauca	Mondomo	1996	5	C8
CIO-378, 379, 381, 382, 385, 387, 388, 389, 390, 391	Cauca	Cajibío	1996	5	C8

* CIAT, *Xanthomonas* collection, Centro Internacional de Agricultura Tropical; CIO, CIAT-ORSTOM collection at Biotechnology Unit, CIAT, Cali, Colombia. All strains are field isolates except the reference strain CIAT 1121.

ECZ: 1, subhumid tropics; 2, acid-soil savannas; 5, high-altitude tropics.

pthB haplotypes as previously published (Restrepo & Verdier, 1997) or as determined in this study.

RFLP analyses were performed on these ten strains. All procedures were identical to that previously described (Restrepo & Verdier, 1997).

the MCA analysis was estimated by the cophenetic coefficient. A genetic diversity index (Ht) was calculated for each cluster based on the band presence or absence. Ht represents the probability that two strains randomly chosen and belonging to the same cluster are different (Nei, 1973).

RESULTS

Selection of AFLP enzymes and primers

AFLP markers were assessed for their usefulness in characterizing molecular diversity among *Xam* strains. Six strains were analysed with all 64 possible +1/+1 *EcoRI/MseI*, *PstI/MseI*, *EcoRI/TaqI*, *PstI/TaqI* primer combinations and the additional *PstI*+GG/*MseI*+G combination. An analysis of the results showed that

banding patterns obtained by using restriction enzymes with G+C-rich recognition sequences, such as *TaqI* (T↓CGA) and *PstI* (CTGCA↓G), contained more bands than ngerprints generated with restriction enzymes with A+T-rich sequences, such as *MseI* (T↓TAA) and *EcoRI* (G↓AATTC) (Table 2). Fingerprints were also more complex when G or C was the selective base on the primers. For example, when *Xam* DNA was digested with *PstI/TaqI* and G was the selective base for the *PstI* primer in the first amplification, banding patterns were difficult to read because of the high number of bands. Replacing *TaqI* with *MseI* in the *EcoRI/TaqI* combination led to a threefold decrease in the number of bands. In general, bands appeared weak when A was the selective base for the *PstI* or *EcoRI* primers. Fingerprints

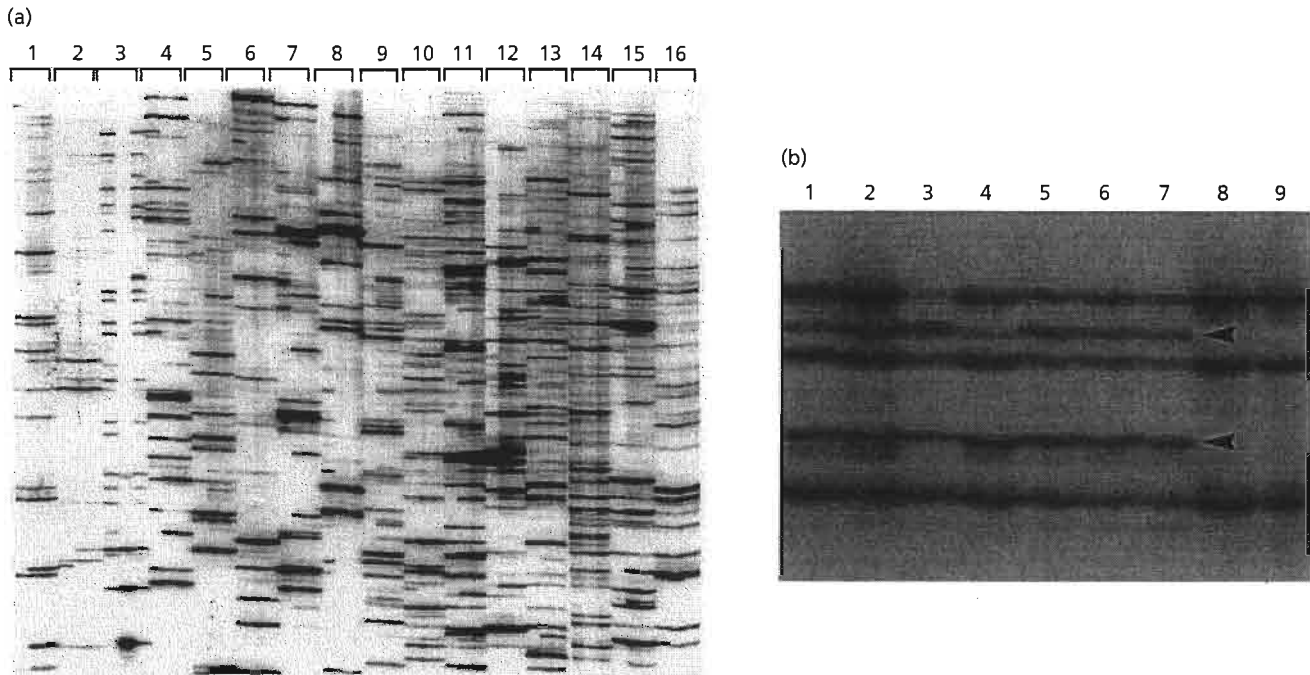


Fig. 1. (a) AFLP patterns of *XamI*, using 16 different +1/+1 primer combinations. DNA templates were digested with *EcoRI/TaqI* and the same three strains were used for each primer combination: CIO-46 (ECZ2), CIO-299 (ECZ5) and CIO-300 (ECZ5). The primer combinations are (1) +A/+A, (2) +A/+T, (3) +A/+C, (4) +A/+G, (5) +T/+A, (6) +T/+T, (7) +T/+C, (8) +T/+G, (9) +C/+A, (10) +C/+T, (11) +C/+C, (12) +C/+G, (13) +G/+A, (14) +G/+T, (15) +G/+C, (16) +G/+G. (b) A section of AFLP fingerprints of *XamI* strains using the combination *EcoRI+T/MseI+A*. Arrows indicate some polymorphic bands among ECZ5 strains. The strains are (1) CIAT-1121, (2) CIO-298, (3) CIO-299, (4) CIO-300, (5) CIO-301, (6) CIO-302, (7) CIO-303, (8) CIO-304, (9) CIO-306.

Table 2. Number of polymorphic bands out of total bands (shown in fraction form) obtained by AFLP analysis with 65 different primer combinations after digestion with *EcoRI/MseI*, *PstI/MseI*, *EcoRI/TaqI* and *PstI/TaqI*

The combinations shown in bold were selected for further analyses.

Enzyme	Base	<i>MseI</i>				<i>TaqI</i>			
		A	T	C	G	A	T	C	G
<i>EcoRI</i>	A	*	*	4/15	5/18	5/27	8/30	4/41	10/41
	T	21/36	21/39	3/19	1/6	7/23	2/21	11/26	15/26
	C	6/17	3/19	1/20	2/12	13/47	1/34	13/64	13/41
	G	5/11	3/18	3/14	2/15	14/45	1/39	16/50	3/34
<i>PstI</i>	A	*	*	*	*	*	*	*	*
	T	13/27	9/22	11/26	13/38	15/31	*	14/30	11/28
	C	17/27	13/25	25/28	20/39	18/47	*	21/28	23/32
	G	14/60	8/45	13/50	10/70				
	GG				9/27				

* Very few and weak bands.

Not determined because of the complexity of banding patterns.

Not studied.

obtained with the primer combination *PstI+GG/MseI+G* (27 bands) were less complex than those obtained with the combination *PstI+G/MseI+G* (70

bands). This result highlights the importance of carefully choosing the selective base composition of AFLP primers. Fig. 1(a) shows the influence of the selective

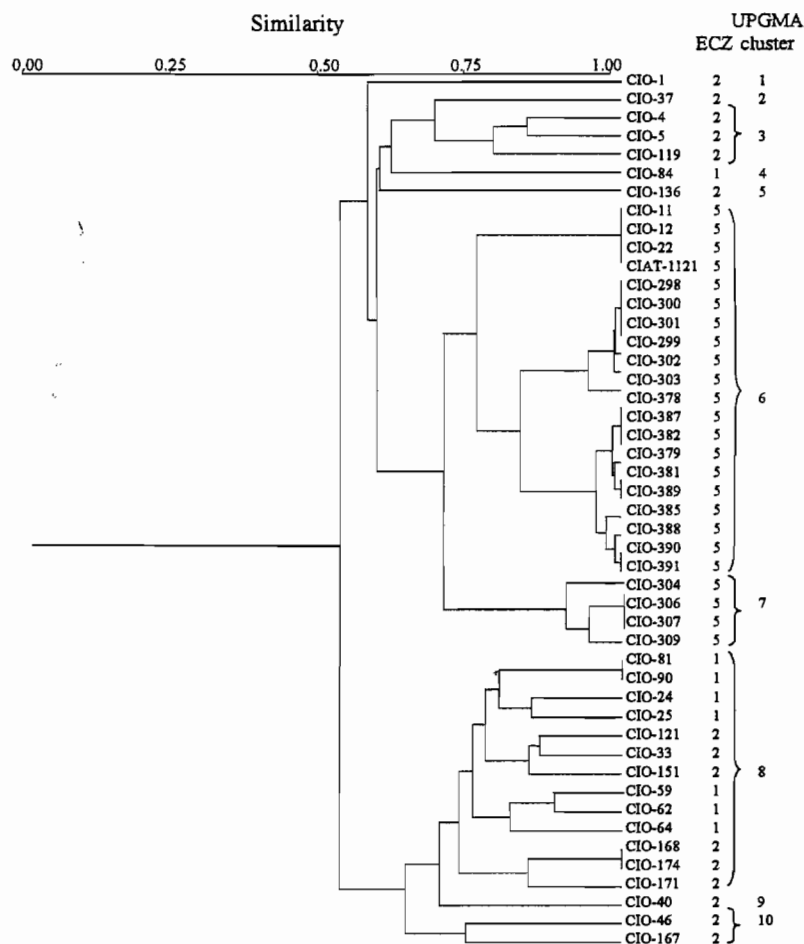


Fig. 2. Dendrogram of 47 *Xam* strains based on AFLP analysis using the unweighted pair group arithmetic mean (UPGMA) program of NTSYS-PC (version 1.80; Rohlf, 1994). The ECZ and the UPGMA clusters are indicated.

nucleotides added to the AFLP primers on fingerprint complexity, using *EcoRI* and *TaqI*.

In the preliminary trials to select successful primer combinations, polymorphic bands were found within strains collected in ECZ5 (Fig. 1b) that belong to the same *pthB* haplotype, a result that was not obtained with RFLP assays, even with the highly discriminative *pthB* probe. Polymorphic AFLP bands were also found between strains from ECZ5 and other ECZs. Eight primer combinations were selected according to reproducibility, percentage and number of polymorphic bands specific to strains from ECZ5, and polymorphism among ECZ5 strains. The combinations selected are shown in Table 2. When testing the reproducibility of the results, less than 1% of the bands were evaluated differently. Therefore, the AFLP methodology gave highly reproducible bands.

Cluster analysis

Analysis of 47 *Xam* strains presented a total of 322 AFLP bands from the eight primer combinations. Between 28 and 64 bands per strain were obtained, ranging from 40 to 350 bp. However, a high number of bands per primer combination were monomorphic. Consequently, we

considered 173 bands (53% of total bands) for the MCA and cluster analyses.

When the 173 polymorphic AFLP bands were used for cluster analysis, different dendrograms were obtained because of ties occurring when the strains were assigned to a group. A strain which is equidistant to two clusters can be equally assigned to either one of these, and consequently the analysis can give different dendrograms. The dendrograms obtained were similar, with minor differences in the arrangement of the isolates collected in ECZ1 and ECZ2. The arrangement of the ECZ5 strains was identical in all dendrograms. Fig. 2 shows the dendrogram that had the highest cophenetic correlation coefficient ($r = 0.95$) to the similarity matrix. The cophenetic correlation coefficient measures the agreement between the similarity values implied by the dendrogram and those of the original similarity matrix (Sneath & Sokal, 1973).

The set of 47 strains can be classified into 10 clusters using 70% similarity as a cut-off point (Fig. 2). We observed a general agreement between the ECZs from which the strains originated and nine of the clusters (Fig. 2). Clusters 6 and 7 consisted of strains from only ECZ5 beyond 71% similarity. Clusters 3 and 10 grouped few strains collected in ECZ2. Clusters 1, 2, 4, 5 and 9 each

consisted of one strain only. Cluster 8 grouped strains originating from ECZs 1 and 2. However, strains within cluster 8 that were collected in the same ECZ showed about 75% similarity.

AFLP allowed the discrimination of closely related strains collected in ECZ5 (Fig. 1b). These strains were grouped into two separate clusters (Fig. 2): cluster 6, which grouped 21 strains collected in 1995 and 1996 in Cajibío and Mondomo, and cluster 7, which consisted of four strains collected in 1996 in Mondomo. Within cluster 6, the location where strains were collected correlated with subclusters at 80% similarity. Both clusters formed by ECZ5 strains presented more than 68% similarity between them and less than 57% similarity with clusters grouping strains collected in ECZs 1 and 2.

MCA

The MCA performed on the set of 47 *Xam* strains separated the strains into seven clusters (data not shown). The first three dimensions explained 47.4% of the variation observed among strains. The first dimension explained 25% of the variation and was effective in separating ECZ5 strains from *Xam* strains collected in ECZs 1 and 2. Twenty different AFLP bands allowed the differentiation between ECZ5 strains. In general, a good correlation existed between unweighted pair group arithmetic mean clusters and MCA clusters. Moreover, MCA cluster 4 grouped strains from ECZ5 (unweighted pair group arithmetic mean cluster 6 and 7) and a strain (CIO-136) collected in ECZ2. The Ht was determined for each cluster, and was low for all clusters, which indicates a high level of similarity among strains belonging to the same cluster. The MCA also helped in identifying AFLP bands specific to the strains and thus significant for clustering of the strains.

Comparison of the AFLP and RFLP data

To determine the complementarity or redundancy of the information obtained for the same set of strains, using RFLP with the *pthB* probe and AFLP with eight primer combinations, similarity matrices based on RFLP and AFLP data were compared by correlation analysis. Matrices of genetic similarity estimates, based on both methods, were correlated ($r = 0.79$). Fig. 3 depicts a two-way scattergram of similarities, obtained for each pair of strains and using RFLP or AFLP as the molecular technique. The analysis of the scattergram showed that the results obtained by AFLP and RFLP are correlated but not redundant and that the AFLP technique was more informative than the RFLP for the same set of strains. When RFLP did not detect similarities (similarity = 0), AFLP detected relationships ranking between 0.3 and 0.8 (Fig. 3). Furthermore, for those strains that showed the highest values of similarity with RFLP, AFLP established a similarity range from 0.6 to 1.0 and was better able to differentiate between the strains. AFLP showed identity for fewer cases and not all were

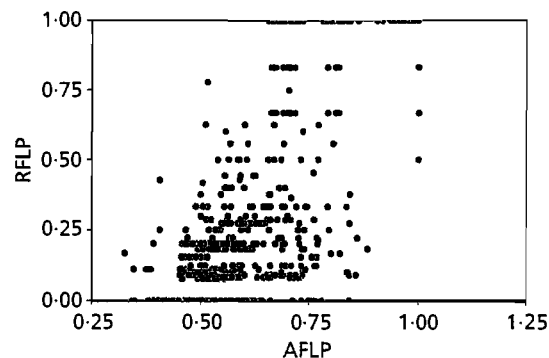


Fig. 3. Comparison of similarity matrices obtained by RFLP and AFLP analyses on 47 *Xam* strains, using MXCOMP, a matrix comparison program of NTSYS-PC (version 1.80; Rohlf, 1994). The axes represent similarity values.

confirmed by RFLP, that is, the results are not redundant.

DISCUSSION

AFLP is an extremely useful and reliable technique for detecting polymorphism in bacterial populations and its reproducibility is reportedly very high (Vos *et al.*, 1995). A total of 173 polymorphisms were detected using eight combinations of selective primers. The use of a different set of restriction enzymes or of more or different primer combinations can dramatically increase the number of polymorphisms detected. Bacterial genomes are relatively small and, in general, one selective base for both primers yields scorable banding patterns (Janssen *et al.*, 1996). A complex and informative fingerprint can thus become useful by making small changes in the primer sequence. The appropriate choice of restriction enzymes, and the number and base composition of selective bases, determine the usefulness and applicability of AFLP fingerprints in diversity studies.

The AFLP technique conditions and primer combinations that permit the assessment of *Xam* genetic diversity were established. We used three enzymes proposed by Janssen *et al.* (1996): *EcoRI*, *TaqI* and *MseI*. In *Xam* DNA, fragments obtained after digestion with *EcoRI/TaqI* were smaller than after digestion with *MseI* instead of *TaqI*. Janssen *et al.* (1996) also reported that in most eukaryotic DNAs, A+T-rich *MseI* produced much smaller restriction fragments than *TaqI*. Additionally, with *Xam* we demonstrated that the use of *PstI* generates fingerprints with an adequate number of suitably sized fragments. The use of a set of four enzymes and eight primer combinations (Table 2) is proposed as a standard set to characterize *Xam*. These combinations could be further tested for bacteria that belong to different pathovars of *Xanthomonas axonopodis*.

The efficiency of two techniques for measuring genetic diversity in *Xam* was compared: RFLP analysis, which is

currently in use in *Xam* studies (Restrepo & Verdier, 1997; Verdier *et al.*, 1993), and AFLP. Bragard *et al.* (1997) and Valsangioioco *et al.* (1995) demonstrated the concordance between results obtained by RFLP, using ribosomal or genomic probes, and AFLP in molecular typing of *Xanthomonas translucens* and *Legionella pneumophila*, respectively. Here, we show that results obtained from AFLP agree well with results obtained from RFLP, using the pathogenicity gene *pthB* as a probe (Restrepo & Verdier, 1997); the AFLP data not only supported but also extended the RFLP/*pthB* analysis by revealing the existence of sub-groups among the ECZ5 *Xam* population. By having a superior discriminative power in differentiating highly related strains belonging to the same pathovar, AFLP analysis is a valuable alternative in *Xam* population studies.

Xam population ECZ5 is a homogeneous group of strains showing high levels of similarity. The low level of molecular variation among ECZ5 strains may be explained by two hypotheses: (i) the introduction of *Xam* to this ecozone is recent and, most probably, only a few *Xam* strains were introduced through contaminated planting material from another ECZ; and (ii) homogeneity within the host population is reflected in the pathogen population. In this ecozone, the cassava varieties grown are few in number as a result of local preferences and production constraints limit the host's genetic base (Restrepo & Verdier, 1997).

AFLP results support the hypothesis that strains from ECZ5 form a genetically and evolutionary separate group. Strong evidence exists to suggest that the pathogen migrates between and within ECZs in Colombia (Lozano, 1986; Restrepo & Verdier, 1997), but because of the low similarity observed between ECZ5 strains and strains collected in other ECZs, the origin of the ECZ5 strains remains unclear. A further accurate analysis of ECZ5 strains and a study of their evolution are needed to understand the introduction of these strains to ECZ5.

Our study demonstrated that AFLP may be applied in *Xam* diversity studies, particularly for those populations where RFLP/*pthB* analyses present low levels of diversity. AFLP markers can also be used to identify particular races or pathotypes to monitor the dynamics of AFLP haplotypes within each region and deploy cassava varieties resistant to the pathogen. In addition to population studies, AFLP DNA fingerprinting may facilitate the identification of polymorphisms linked to virulence factors and contribute to the understanding of plant-bacteria interactions at the molecular level.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge William Roca (CIAT) for his support. We are grateful to Martin Fregene and Fernando Angel for critically reading the manuscript. We thank Claude Bragard for his comments and advice on the first draft of the manuscript, and Elizabeth de Páez for editing. We are very grateful to Pedro Rocha for his helpful comments throughout this work and technical assistance. This research was

supported by grants from ORSTOM and CIAT and by a doctoral fellowship awarded to S. Restrepo by ORSTOM.

REFERENCES

- Berthier, Y., Verdier, V., Guesdon, J. L., Chevrier, D., Denis, J. B., Decoux, G. & Lemattre, M. (1993). Characterization of *Xanthomonas campestris* pathovars by rRNA gene restriction patterns. *Appl Environ Microbiol* 59, 851–859.
- Boucher, C., Barberis, P., Trigalet, A. & Demery, D. (1985). Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: isolation of Tn5-induced avirulent mutants. *J Gen Microbiol* 131, 2449–2457.
- Bragard, C., Singer, E., Alizadeth, A., Vauterin, L., Maraite, H. & Swings, J. (1997). *Xanthomonas translucens* from small grains: diversity and phytopathological relevance. *Phytopathology* 87, 1111–1117.
- Dijkshoorn, L., Aucken, H., Gerner-Smidt, P., Janssen, P., Kaufmann, M. E., Garaizar, J., Ursing, J. & Pitt, T. L. (1996). Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 34, 1519–1525.
- Folkerstma, R. T., Rouppe van der Voort, N. A. M., de Groot, K. E., van Zandvoort, P. M., Schots, A., Gommers, F. J., Helder, J. & Bakker, J. (1996). Gene pool similarities of potato cyst nematode populations assessed by AFLP analysis. *Mol Plant Microbe Interact* 9, 47–54.
- Huys, G., Altwegg, M., Hanninen, M. L. & 7 other authors (1996). Genotypic and chemotaxonomic description of two subgroups in the species *Aeromonas eucrenophila* and their affiliation to *A. encheleia* and *Aeromonas* DNA hybridization group 11. *Syst Appl Microbiol* 19, 616–623.
- Janssen, P. & Dijkshoorn, L. (1996). High resolution DNA fingerprint of *Acinetobacter* outbreak strains. *FEMS Microbiol Lett* 142, 191–194.
- Janssen, P., Coopman, R., Huys, B., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M. & Kersters, K. (1996). Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool to bacterial taxonomy. *Microbiology* 142, 1881–1893.
- Leach, J. E., Rhoads, M. L., Vera Cruz, C. M., White, F. F., Mew, T. W. & Leung, H. (1992). Assessment of genetic diversity and population structure of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* with a repetitive DNA element. *Appl Environ Microbiol* 58, 2188–2195.
- Leung, H., Nelson, R. J. & Leach, J. E. (1993). Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *Adv Plant Pathol* 10, 157–205.
- Lin, J. J., Kuo, J. & Ma, J. (1996). A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. *Nucleic Acids Res* 24, 3649–3650.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T. & de Bruijn, F. J. (1995). Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85, 528–536.
- Lozano, J. C. (1986). Cassava bacterial blight: a manageable disease. *Plant Dis* 70, 1089–1093.
- Maes, M., Garbeva, P. & Kamoen, O. (1996). Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leaf streak using rDNA spacer sequences and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86, 63–69.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci* 70, 3321–3323.
- O'Neill, N. R., van Berkum, P., Lin, J. J., Kuo, J., Ude, G. N.,

- Kenworthy, W. & Saunders, J. A. (1997).** Application of amplified restriction fragment length polymorphism for genetic characterization of *Colletotrichum* pathogens of alfalfa. *Phytopathology* 87, 745-750.
- Picardeau, M., Prodhom, G., Raskine, L., Le-Pennec, M. P. & Vincent, V. (1997).** Genotypic characterization of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol* 35, 25-32.
- Restrepo, S. & Verdier, V. (1997).** Geographical differentiation of the population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. *Appl Environ Microbiol* 63, 4427-4434.
- Rohlf, F. J. (1994).** *NTSYS-PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Syst, Version 1.80*. New York: Exeter Software.
- SAS Institute (1989).** *SAS/IML Software: Usage and Reference, Version 6*, 1st edn. Cary, NC: SAS Institute.
- Smith, J. J., Scott-Craig, J. S., Leadbetter, J. R., Bush, G. L., Roberts, D. L. & Fulbright, D. W. (1994).** Characterization of random amplified polymorphic DNA (RAPD) products from *Xanthomonas campestris* and some comments on the use of RAPD products in phylogenetic analysis. *Mol Phylogenet Evol* 3, 135-145.
- Sneath, P. H. A. & Sokal, R. R. (1973).** *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. San Francisco: W. H. Freeman.
- Valsangiacomo, C., Baggi, F., Gaia, V., Balmelli, T., Peduzzi, R. & Piffaretti, J.-C. (1995).** Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. *J Clin Microbiol* 33, 1716-1719.
- Vanechoutte, M. (1996).** DNA fingerprinting techniques for microorganisms: a proposal for classification and nomenclature. *Mol Biotechnol* 6, 115-142.
- Verdier, V., Dongo, P. & Boher, B. (1993).** Assessment of genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *J Gen Microbiol* 139, 2591-2601.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M. & 8 other authors (1995).** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23, 4407-4414.
-

Received 31 March 1998; revised 4 August 1998; accepted 16 September 1998.

2.4 Conclusion

La technique RFLP utilisant la sonde *pthB* s'est avérée très utile pour la caractérisation des populations de *Xam* et confirme les résultats de Verdier *et al.* (231). La sonde *pthB* est plus discriminante que les sondes génomiques répétées ou l'analyse du pattern de restriction des plasmides ou encore le ribotypage.

L'échantillonnage a consisté en la collecte de souches de *Xam* dans trois écozones (ECZs1, 2 et 5). Dans l'ECZ7 la maladie n'a pas été détectée. Dans chaque écozone et pour chaque localité, plusieurs champs ont été prospectés. Au total 15 localités ont été visitées. La caractérisation moléculaire des souches de *Xam* a permis de classer la population Colombienne de *Xam* en sous-populations correspondant aux écozones. La connaissance de la structure des populations de *Xam* est utile pour suivre l'évolution de l'agent pathogène. Elle est d'autant plus informative et utile si elle est corrélée aux caractéristiques biologiques du pathogène. Nous avons mis en évidence une corrélation entre la différenciation en groupes génétiques (haplotypes) et certaines caractéristiques biologiques du pathogène, à savoir son adaptation aux conditions écologiques particulières et aux génotypes de manioc adaptés à ces mêmes conditions. Cette étude permet d'orienter les stratégies d'échantillonnage postérieures et d'orienter le choix des souches pour la caractérisation du pouvoir pathogène des souches de *Xam*.

La migration de souches entre localités d'une même ECZ a été mise en évidence. Elle favorise le maintien de la variabilité génétique de l'agent pathogène à l'intérieur des ECZ. Le principal mode de dissémination de la maladie étant le transport de boutures contaminées, l'information acquise ici nous permet de faire des recommandations immédiates aux agriculteurs. Elles concernent le contrôle sanitaire des boutures de manioc utilisées pour les nouvelles plantations.

Nous avons adapté et développé la technique AFLP pour l'étude des populations de *Xam*. Nous proposons ainsi l'utilisation de huit combinaisons d'amorces pour la caractérisation des souches de *Xam*. La technique AFLP peut être appliquée à l'étude des relations phénétiques de populations génétiquement très homogènes. L'AFLP nous a permis de différencier les populations de *Xam* de l'ECZ5, qui avaient montré, par la technique RFLP, une structure

clonale. La comparaison des matrices de similarité obtenues par les analyses RFLP et AFLP montre une corrélation élevée. Les deux techniques, RFLP et AFLP, analysent des régions différentes du génome de *Xam* et par conséquent fournissent des informations complémentaires sur la variabilité génétique de l'agent pathogène.

Une question qui émerge de cette étude est: comment relier la variabilité génétique des souches aux caractéristiques de pouvoir pathogène. Si il existe une corrélation entre les haplotypes et le pouvoir pathogène, l'étude de l'évolution de la structure en haplotype peut alors guider l'introduction des cultivars résistantes. L'étape suivante de notre travail est la caractérisation du pouvoir pathogène du pathovar *manihotis* et la recherche de l'existence d'interactions différentielles entre souches et cultivars (pathotypes) Le choix des souches et des cultivars qui sont utilisés doit tenir compte à la fois de la variabilité génétique et de l'origine géographique des souches et des cultivars.

Nous avons adopté la stratégie proposée par Nelson *et al.* (164), et Adhikari *et al.* (1) qui consiste à choisir des souches de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* représentatives des différents clusters ou haplotypes détectés par RFLP. Ainsi, nous proposons d'utiliser une souche de *Xam* représentative de chaque haplotype (26 au total) pour caractériser les réactions entre souches et cultivars de manioc.

**3 VARIABILITE DU POUVOIR PATHOGENE DE
XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. *MANIHOTIS***

3 VARIABILITÉ DU POUVOIR PATHOGÈNE DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *MANIHOTIS*

3.1 Introduction

Les données obtenues sur la caractérisation génétique du pathogène, nous renseignent que partiellement sur les caractéristiques de la population de *Xam*. La caractérisation de la virulence des souches (ou pathotypes) sur une gamme de cultivars différentiels est essentielle et, permet d'obtenir une information utile pour les paysans et les améliorateurs notamment pour la sélection de cultivars possédant une résistance stable au pathogène (130) En effet, l'évaluation des cultivars se fait vis à vis des différents pathotypes du pathogène. Cependant, sil n'existe pas d'interaction spécifique souche x cultivar, l'évaluation variétale peut se faire en utilisant les souches les plus agressives, même si celles-ci ne sont pas les plus fréquemment rencontrées dans la population.

Au Zaïre en 1970, une forte attaque de bactériose a entraîné la destruction complète des plantations (145). L'apparition de souches plus agressives ou ayant un nouveau spectre de virulence peut expliquer l'effondrement de la résistance des cultivars qui jusqu'à présent montraient un bon niveau de résistance (145). Takatsu *et al.* (214) suggèrent également que l'apparition de nouvelles souches est le principal facteur responsable de l'effondrement de la résistance de plusieurs cultivars. Des mutations affectant l'agressivité ou la virulence des souches ont été mises en évidence dans le genre *Xanthomonas* (212).

Cependant, les connaissances sur l'existence d'une interaction souche de *Xam* x cultivar de manioc sont limitées. A ce jour, aucun gène de résistance à la bactériose vasculaire du manioc, n'a été caractérisé. Il n'existe pas de gamme d'hôte permettant de mettre en évidence des réactions différentielles souches x cultivar. Aucune race ou pathotype n'a pu être caractérisé.

La stratégie que nous développons dans ce chapitre est la suivante. Quatre - vingt treize cultivars de manioc appartenant à la core collection du CIAT sont caractérisés par la technique AFLP et pour leur résistance /sensibilité à la bactériose vasculaire. Sur la base de cette analyse, nous avons sélectionné un nombre restreint de cultivars qui serviront à l'étude plus approfondie des interactions souche x cultivar en conditions contrôlées.

Afin de mettre en évidence l'existence d'une interaction différentielle souche x cultivar, la gamme d'hôte est inoculée avec une souche représentative des 26 haplotypes caractérisés

précédemment. Deux techniques d'inoculation ont été testées. La gamme d'hôte a été également évaluée en champ durant deux cycles de culture.

L'étude AFLP décrite dans le chapitre 2 a permis la différenciation des souches au sein de l'ECZ5. L'étude de l'interaction souches de l'ECZ5 x cultivar est développée dans la dernière partie de ce chapitre.

Le tableau 6 et les figures 12A, 12B et 13 représentent les échelles utilisées pour l'évaluation de la maladie en conditions contrôlées et au champ.

3.2 Sélection de la gamme d'hôte différentielle

AFLP assessment of genetic variability in cassava accessions (*Manihot esculenta*) resistant and susceptible to the cassava bacterial blight (CBB). Sanchez G., Restrepo S., Duque M.C., Fregene M., Bonierbale M. and Verdier V. 1999. Genome 42: 163-172.

AFLP assessment of genetic variability in cassava accessions (*Manihot esculenta*) resistant and susceptible to the cassava bacterial blight (CBB)

Gilda Sanchez, Silvia Restrepo, Myriam-Cristina Duque, Martln Fregene, Merideth Bonierbale, and Valérie Verdier

Abstract: Cassava bacterial blight (CBB) is caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*). Resistance is found in *Manihot esculenta* and, in addition, has been introgressed from a wild relative, *M. glaziovii*. The resistance is thought to be polygenic and additively inherited. Ninety-three varieties of *M. esculenta* (Crantz) were assessed by AFLPs for genetic diversity and for resistance to CBB. AFLP analysis was performed using two primer combinations and a 79.2% level of polymorphism was found. The phenogram obtained showed between 74% and 96% genetic similarity among all cassava accessions analysed. The analysis permitted the unique identification of each individual. Two *Xam* strains were used for resistance screening. Variation in the reaction of cassava varieties to *Xam* strains was observed for all plant accessions. The correlation of resistance to both strains, had a coefficient of 0.53, suggesting the independence of resistance to each strain. Multiple correspondence analysis showed a random distribution of the resistance/susceptibility response with respect to overall genetic diversity as measured by AFLP analysis. A total heterozygosity index was calculated to determine the diversity within clusters as well as among them. Our results demonstrate that resistance to CBB is broadly distributed in cassava germplasm and that AFLP analysis is an effective and efficient means of providing quantitative estimates of genetic similarities among cassava accessions.

Key words: amplified fragment length polymorphism, genetic base, resistance screening, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*.

Résumé : La bactériose du manioc est causée par *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*). La résistance observée chez *Manihot esculenta* a été introduite à partir de l'espèce sauvage *M. glaziovii*. Elle est supposée polygénique et héritée de manière additive. Quarante-trois variétés de *M. esculenta* (Crantz) ont été évaluées à la fois par la technique AFLP et pour leur résistance/sensibilité à la bactériose. L'analyse AFLP a été faite avec deux combinaisons d'amorces primers et montre un taux de polymorphisme de 79,2%. Le phénogramme obtenu montre entre 74% et 96% de similarité entre les variétés analysées. L'analyse permet l'identification de chaque variété montrant ainsi qu'il n'y a pas de duplicat au sein de l'échantillon utilisé. Deux souches de *Xam* ont été utilisées pour l'évaluation de la résistance. On observe une variabilité dans la réaction des variétés aux deux souches de *Xam*. La corrélation de la résistance à *Xam* indique un coefficient de 0,53, suggérant que la résistance à chaque souche de *Xam* est indépendante. Une analyse de correspondance multiple met en évidence une distribution au hasard de la réaction résistance/sensibilité par rapport à la diversité génétique évaluée par AFLP. Un index total d'hétérozygotie est calculé afin de déterminer la diversité aussi bien entre les groupes qu'au sein des groupes obtenus. Nos résultats montrent que la résistance est largement distribuée au sein des variétés de manioc et que l'AFLP est une méthode efficace et performante qui permet une évaluation quantitative de la similarité entre les variétés de manioc.

Mots clés : polymorphisme de la longueur des fragments amplifiés, base génétique, évaluation de la résistance, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*.

Corresponding Editor: G. Scoles.

Received May 21, 1998. Accepted August 28, 1998.

G. Sanchez, S. Restrepo, M.-C. Duque, M. Fregene. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Biotechnology Research Unit, A.A. 6713, Cali, Colombia.

M. Bonierbale. Centro Internacional de la Papa (CIP), A.A. 1558, Lima, Peru.

V. Verdier.^{1,2} Institut de Recherche pour le Développement. GeneTrop, B.P. 5045, 34032 Montpellier, France.

¹Author to whom all correspondence should be addressed (e-mail: v.verdier@cgiar.org).

²Present address: CIAT, International Center for Tropical Agriculture. Biotechnology Research Unit, A.A. 6713, Cali, Colombia.

Introduction

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a starchy root crop that feeds about 500 million people throughout the tropics. It is produced mainly by small farmers for food and small-scale industrial use. The genetic resources available for cassava improvement include improved breeding lines, landraces, and wild relatives of the crop. Information about the structure of these gene pools is important in the development of sound strategies for germplasm conservation and use (Bonierbale et al. 1994). Cassava bacterial blight (CBB), a disease that is economically significant in Latin America and Africa, is caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*), a systemic and epiphytic pathogen (Lozano and Sequeira 1974). Yield losses range between 12% and 100%. The disease also affects the quality of planting material (Lozano 1975; Boher and Verdier 1994).

The deployment of resistant varieties is the major method of CBB control. Resistance has been found in *M. esculenta* and in its wild relative *M. glaziovii* (Hahn 1978). It is thought to be polygenic and additively inherited (Lozada 1990), but the genes involved in the resistance response have not yet been identified (Verdier et al. 1997). Resistance is expressed as a reduced rate of disease development in stems (Umemura and Kawano 1983), with the number of infected xylem vessels lower in resistant than in susceptible cultivars (Kpémoua et al. 1996). Defense mechanisms have been characterised and include phenol production and xylem vessel occlusion by lignin-like compounds (Kpémoua et al. 1996).

Genetic studies show that South American *Xam* populations are more genetically diverse than African populations (Verdier et al. 1993). Recently, geographical differentiation of the pathogen was shown in Colombia (Restrepo and Verdier 1997). Although variation in the aggressiveness of *Xam* strains has been reported (Maraité and Meyer 1975; Restrepo and Verdier 1997), no clear interactions between cassava cultivars and strains have been yet established. The most limiting factor in such studies is the lack of a suitable way of choosing the cassava varieties that can be used for establishing an appropriate set of host differentials. Currently, more than 6000 accessions are available in the world cassava collection held at CIAT. The use of molecular marker technology has provided the potential to speed up plant improvement for a variety of objectives including disease resistance. Specifically, understanding the genetic relationships between resistant and susceptible accessions is the first step in choosing the most appropriate segregating populations for mapping possible new sources of resistance.

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) is a reliable, PCR-based marker system for obtaining quantitative estimates of genetic relationships (Vos et al. 1995). This technique is advantageous because variability can be assessed at a large number of independent loci, and data are obtained quickly and reproducibly (Majer et al. 1996; O'Neill et al. 1997). Since polymorphism is detected as the presence or absence of amplified restriction fragments, AFLPs are usually considered dominant markers (Mackill et al. 1996; Powell et al. 1996). The resulting DNA fingerprint provides a large number of genetic markers and the multiplex ratio, defined as the number of information points

analysed per experiment, is much higher than for other types of markers (Powell et al. 1996). AFLP is reported to be more informative than RAPD, isoenzymes, nuclear RFLP, or cDNA RFLP, in establishing relationships within other crops (Hill et al. 1996; Mackill et al. 1996; Sharma et al. 1996; Hongtrakul et al. 1997). Phenetic trees based on AFLP data are consistent with known taxonomic relationships and similar to those developed with RFLP data (Hill et al. 1996; Sharma et al. 1996). Recently, AFLPs have been used to evaluate cassava diversity, to estimate genetic relationships in the genus *Manihot*, and to identify putative species-specific markers useful for germplasm classification (Roa et al. 1997).

This study aims to (i) describe the distribution of genetic variability within a large group of accessions representing the genetic diversity available in cassava germplasm; (ii) assess their resistance or susceptibility of these accessions to bacterial blight in order to determine if resistance is general or specific; and (iii) help in identifying accessions that could be selected for improvement programs and in studies of host-pathogen interaction.

Material and methods

Plant material

Ninety-three accessions of *Manihot esculenta* (Crantz), from the international core collection and the cassava improvement program at CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) were analysed (Table 1). The accessions included were either landraces (coded by their origin) or improved clones classified as ELITE in relation to agronomic traits, such as resistance to biotic or abiotic stresses and yield. The ELITE accessions are coded as follows: CG and CM are CIAT cassava improvement program-controlled crosses; SG and SM are CIAT cassava improvement open-pollinated crosses. The landraces are coded by geographic origin (Table 1).

Resistance screening

CBB resistance screening was conducted on the 93 cassava accessions. Two *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* strains, CIAT 1117 and Orst X27, previously characterised as virulent were used (Verdier et al. 1994; Kpémoua et al. 1996). For long-term storage, *Xam* strains were conserved in glycerol at -80°C . Strains were streaked on LPGA media (5 g l^{-1} yeast extract, 5 g l^{-1} peptone, 5 g l^{-1} glucose, and 15 g l^{-1} agar) 12 h before inoculation. The cassava plants for testing were grown from mature stem cuttings in sterile soil. Ten plants per accession and per each bacterial strain were tested in the greenhouse at $28:19^{\circ}\text{C}$ day:night temperatures, under a 12 h daylight photoperiod, and 80% relative humidity, in Cali, Colombia. Stems were inoculated as described by Verdier et al. (1994). Disease progress was recorded at 7, 14, and 30 d after inoculation, with the following disease severity rating: score 0 = no disease symptoms; 1 = necrosis around the inoculation point; 2 = gum exudation on stem; 3 = wilting of one or two leaves and exudation; 4 = wilting of more than two leaves; 5 = complete wilting and dieback. For the present analysis, plants with a disease reaction of ≤ 3 were grouped as resistant, while those with a disease reaction of > 3 were classified as susceptible.

DNA extraction and purification

DNA was extracted using some modifications of the Gilbertson et al. (1991) method. Samples of 8-mo-old leaf tissue were collected and ground in liquid nitrogen, then extracted in extraction buffer (100 mM Tris-HCl at pH 8.0; 50 mM EDTA at pH 8.0;

Table 1. Source and origin of the cassava accessions used in this study.

Accession ^a	Cluster		Disease reaction ^b		Accession	Cluster		Disease reaction	
	UPGMA	MCA	X-27	CIAT1117		UPGMA	MCA	X-27	CIAT1117
CG1141-1	A	3	S	S	MBRA872	C	6	S	S
CG402-11	G	4	S	S	MBRA881	C	8	R	R
CG501-1	D	2	S	S	MBRA886	C	7	R	R
CG501-15	D	1	R	R	MBRA900	B	8	R	R
CG501-16	D	2	S	S	MBRA902	A	6	S	S
CG501-18	D	1	R	S	MBRA908	C	8	S	S
CG501-2	D	1	R	R	MBRA929	B	8	S	S
CM1335-4	D	2	S	R	MBRA99	B	8	S	S
CM1585-13	D	1	S	S	MCOL1438	B	8	S	S
CM2177-2	A	4	R	S	MCOL1505	B	7	S	S
CM2623-1	E	9	R	S	MCOL1522	F	n.d.	S	S
CM2952-1	F	9	R	R	MCOL1684	B	8	S	S
CM2952-2	F	9	R	S	MCOL1939	B	7	R	R
CM2952-3	F	9	R	R	MCOL2041	B	7	S	S
CM3171-8	F	9	S	S	MCOL2061	B	9	S	S
CM3306-19	F	2	R	R	MCOL2066	H	2	S	R
CM3306-25	F	2	R	S	MCOL22	H	4	S	R
CM3306-4	A	3	S	S	MCOL2215	I	n.d.	S	S
CM3320-8	F	9	R	R	MCOL2261	J	n.d.	S	S
CM4013-1	F	9	S	S	MCOL647	B	n.d.	S	R
CM4063-6	E	9	R	S	MCUB5	B	7	S	S
CM4733-4	F	0	S	S	MCUB74	B	8	R	R
CM4772-4	F	9	S	S	MECU82	B	6	R	R
CM507-37	A	5	S	S	MIND4	B	7	S	R
CM523-7	A	5	R	R	MIND48	F	9	S	R
CM5286-3	D	9	S	S	MMEX59	B	3	R	S
CM6438-14	D	2	S	R	MNGA19 ^c	B	6	R	R
CM6855-3	A	7	S	S	MNGA2	B	6	S	S
CM6921-3	A	5	S	S	MPAR110	B	8	S	S
CM7389-9	G	3	S	S	MPTR19	B	6	S	S
HMC1	F	9	R	S	MTA11	F	0	S	S
MARG11	A	7	R	R	MVEN25	A	9	S	S
MBOL3	F	n.d.	S	S	MVEN45	A	7	R	R
MBRA106	F	0	S	R	SG104-264	B	6	S	S
MBRA108	F	8	R	R	SG105-11	A	6	R	R
MBRA110	B	8	R	S	SG107-35	A	7	R	R
MBRA12	F	9	S	S	SG427-87	F	7	S	S
MBRA159	F	0	R	S	SG536-1	F	9	S	S
MBRA200	F	0	S	S	SG638-6	J	n.d.	R	S
MBRA383	F	9	S	S	SM1031-2	A	5	S	R
MBRA429	A	5	S	S	SM1053-12	G	4	S	S
MBRA545	B	8	R	R	SM328-1	A	7	R	R
MBRA579	B	6	S	R	SM494-2	B	9	R	R
MBRA605	C	5	S	S	SM524-1	G	2	S	S
MBRA685	B	6	R	R	SM627-5	C	5	S	S
MBRA784	C	6	S	S	SM667-1	D	2	R	S
					SM853-7	H	3	S	S

Note: n.d. = not determined, varieties taken out from the second MCA.

^aAccession codes for improved materials are CG or CM (controlled cross), SG or SM (open-pollinated cross). Landraces are codified as follows: MBra, Brazil; MArg, Argentina; MBol, Bolivia; MCol, Colombia; MCub, Cuba; MEcu, Ecuador; MInd, Indonesia; MMex, Mexico; MPar, Paraguay; MPtr, Puerto Rico; MTai, Thailand; and MVen, Venezuela.

^bPlants with a disease reaction of ≤ 3 were grouped as resistant (R), and those with a score > 3 were classified as susceptible (S).

^cMNGA2 and MNGA19 are elite varieties from IITA (International Institute of Tropical Agriculture, Nigeria).

500 mM NaCl; 100 mM β -mercaptoethanol and 1% PVP40 with 20% SDS, shaken and incubated at 65°C for 20 min. Next, proteins were removed from the samples by addition of 5 mL cold potas-

sium acetate (5 M) followed by precipitation with cold isopropanol (80%), then stored overnight at -20°C. Samples were centrifuged at 14 000 rpm and the supernatant was removed. The pellet

washed with 500 μ L of 70% ethanol, dried for 30 min, and then re-suspended on cold TE buffer (10 mM Tris-HCl at pH 8.0 and 1 mM EDTA at pH 8.0). DNA was treated with RNase (Sigma) for 20 min at 37°C, and visualised on an agarose gel (0.8%). The DNA was quantified, using a Hoefer DyNA Quant 200 fluorometer. It was also verified for the absence of nucleases, which can interfere with AFLP screening, as follows: a 1 μ g sample of DNA was tested with magnesium chloride at a final concentration of 10 mM, incubated at 37°C for 2 h, then visualised on 0.8% agarose gel.

Amplified fragment length polymorphism method

AFLPs were performed as described by Vos et al. (1995), using 500 ng of genomic DNA. Each DNA sample was digested with *EcoRI* and *MseI* (New England BioLabs). Ligation was performed using specific adapters (*EcoRI* Adapter 1-5' CTC GTA GAC TGC GTA CC 3'; Adapter 2-5' AAT TGG TAC GCA GTC 3'; and *MseI* Adapter 1-5' GAC GAT GAG TCC TGA G 3'; Adapter 2-5' TAC TCA GGA CTC A-T 3'). The pre-amplification step was carried out using primers +1/+1 (*EcoRI* primer + A- PE1-5' GAC TGC GTA CCA AAT CA 3', and *MseI* primer + G- PM1-5' GAT GAG TCC TGA GTA AG 3'). Primer labelling was with the *EcoRI* primer +3 using 32^p d[ATP]. This reaction was incubated for 30 min at 37°C. The second amplification reaction was made using 5 μ L of the dilution (1:20) from the first PCR as DNA template, the labelled *EcoRI* primer, and the *MseI* primer +3 in a PCR final volume of 20 μ L. Two sets of primers, out of nine previously tested on 9 of the 93 accessions (A. Bernal and M. Fregene 1997, unpublished results), were selected. PE1A * PM1A (PE1A-5' GAC TGC GTA CCA AAT CAAC 3' * PM1A-5' GAT GAG TCC TGA GTA AGTA 3') and PE1B * PM1D (PE1B-5' GAC TGC GTA CCA AAT CACG 3' * PM1D-5' GAT GAG TCC TGA GTA GGT 3') were used, based on the level of polymorphism and banding pattern found. A control DNA sample was used each time the reaction was performed. An aliquot of 3 μ L of reaction product was mixed with 2 μ L of formamide dye, denatured for 3 min at 100°C, and chilled on ice. The reaction products were size-fractionated on 6% polyacrylamide denaturing gels on a SequiGen (BioRad) sequencing apparatus. Electrophoresis was carried out for 2 h in 1 \times TBE at 40 V cm^{-1} and 50°C. The gels were covered with Saran Wrap, dried under vacuum for 1 h at 80°C, and exposed 24 h on x-ray films (Kodak X-omat LS) for autoradiographs.

Data analyses

AFLPs were generated using two pairs of primers, PE1A * PM1A and PE1B * PM1D. Each clearly variable marker was treated as a separate character and scored as either present (1) or absent (0) across the 93 accessions evaluated. Genetic similarities between pairs of accessions were estimated using the Nei and Li formula (1979), $G_s = 2C(ij) / N(ij)$, where G_s is the measure of genetic similarity between the i th and j th accession, $C(ij)$ is the number of bands shared by i and j , and $N(ij)$ the total sum of scored bands. This definition of similarity excludes from the calculation those bands that are absent in both individuals, because mutual absence cannot necessarily be attributed to a common cause. Weighting the bands that coincide by a factor of 2 permits better differentiation of individuals with low levels of similarity (Tohme et al. 1996). All the similarity analyses were performed in NTSYS-PC (Version 1.80, Rohlf 1994). Phenograms were constructed by employing the DICE option for the similarity coefficient, the UPGMA (unweighted pair group method of averages) clustering method of Sneath and Sokal (1973), and the TREE option to display results graphically. A correlation index was calculated between the similarity matrices resulting from the two different primer combinations to analyse the complementarity or redundancy of information.

Multiple correspondence analysis (MCA) was conducted to evaluate the contribution of specific active variables (AFLP products) to the clustering observed among genotypes. The cophenetic correlation coefficient indicates the extent to which the clustering of genotypes accurately represents the estimates of genetic similarity of the accessions. The MCA analysis allows further insights on the relationships between AFLP genotypes and the identification of bands with large effects on clustering. For this purpose the active variables were those corresponding to the presence or absence of bands; resistance or susceptibility were used as supplementary variables. The analysis was done by employing the CORRESP procedure of SAS (version 6-11; 1989).

In order to define the distribution of diversity found within the germplasm group the coefficient of genetic diversity was calculated. This coefficient describes the genetic differentiation relative to the total population and is given by $G_{st} = D_{st} / H_t$, where D_{st} is the average gene diversity between subpopulations, (including the comparisons of subpopulations with themselves) and H_t is the genetic diversity in the total population, defined by Nei (1973) as $H_t = H_s + D_{st}$ ($H_s = 1 - J_s$, and J_s is the average gene diversity between subpopulations). Thus, the genetic diversity in the total population can be analysed as the genetic diversities within and between subpopulations (Nei 1973).

Using the resistance data categorised as resistant (R) or susceptible (S) as described previously, a correlation index was calculated to determine the independence or correlation of resistance to the different *Xam* strains.

Results

Resistance screening

Variation in the reaction of cassava varieties to *Xam* strains was observed for all plant materials: 13% of all varieties were resistant only to X-27, 11% only to CIAT1117, 25% were resistant to both strains, and 51% were susceptible to both strains (Table 1). The correlation between resistance to strains X-27 and CIAT1117 had a value of 0.53, suggesting independence of resistance to the two strains and the likely presence of more than one gene for resistance.

AFLP analysis

The primer pairs PE1A * PM1A and PE1B * PM1D were chosen from the larger set of primer pairs, based on their relatively higher polymorphism (50 and 26 polymorphic bands, respectively) and resolution of bands in a subset of this germplasm. All 93 accessions were tested, using both primer combinations. A total of 96 bands, 63 from the first combination and 33 from the second was scored (Fig. 1). Of these, only 13 and 7 bands, respectively, were monomorphic, showing a 79% level of polymorphism with this primer combination. The matrices of genetic similarity estimated by the Nei-Li coefficient, based on AFLP patterns from the two separate primer combinations, showed low correlation ($r = 0.12$). This suggests that each combination provided different and therefore complementary information. The analysis permitted differentiation of all individuals, indicating that the collection samples used did not contain genetic duplicates. Repetitions, using the same set of primers and several accessions, consistently yielded the same number and pattern of polymorphic bands (data not shown).

UPGMA cluster analysis

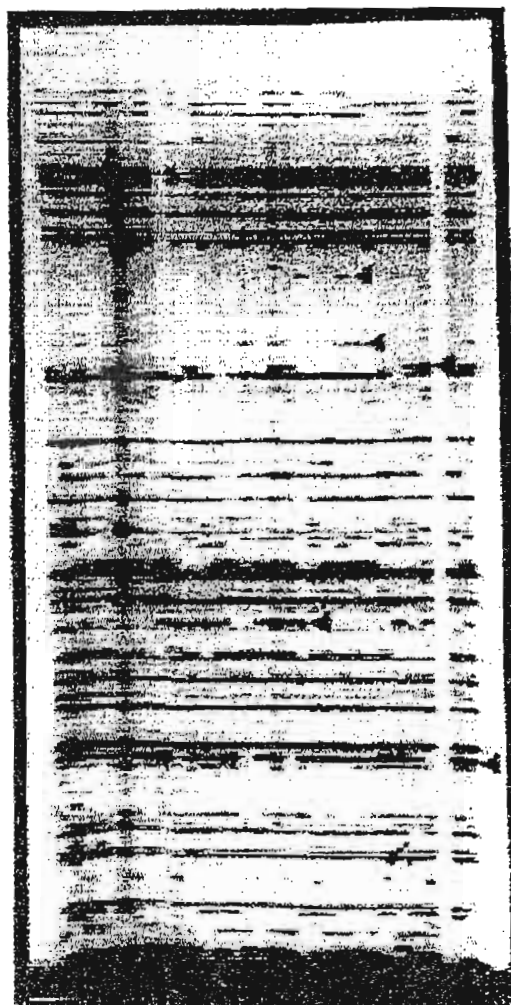
The phenogram obtained shows between 74% and 96% genetic similarity (Fig. 2) among all cassava accessions. The highest similarity was found between two open-pollinated clones (Cluster A), which share the same pistillate parent. At 80% genetic similarity, 10 clusters were defined. Cluster A is composed of landraces from Argentina, Venezuela, and Brazil, and some improved clones; members of this cluster do not show a defined pattern of resistance or susceptibility to either *Xam* strains considered (Table 1). The second and largest cluster (B) is composed of landraces and improved varieties from all three cassava-growing continents (Africa, Asia, and Latin America). The African varieties are improved clones with Brazilian landraces in their pedigrees. CBB resistance response is highly variable in this group (Fig. 2, Table 1). Cluster C is composed of predominantly Brazilian varieties, showing different resistance responses, with genetic similarities ranging from 79% to 94%. Clusters D and E consist of improved varieties developed at CIAT with variable response to CBB. Cluster F, the second largest, is composed of improved varieties, Indonesian, Colombian, Thai, and Brazilian landraces. Cluster G is made up of improved varieties all susceptible to both *Xam* strains. Cluster I has only one member, a Colombian landrace that is susceptible to both strains. Clusters H and J contain Colombian landraces and two improved clones with variable responses to *Xam*.

As expected, most closely related clones, such as the CG501 series, which are a full-sib family, clustered together having genetic similarities between 87% and 91% (Fig. 2). Besides reflecting similar pedigree, this confirms the reliability and additive nature of this molecular data. However, other full-sib families clustered in different groups. For example, CM3306 had one of its three members in cluster A and two members in cluster F, with 80% genetic similarity. The level of heterozygosity in the parental lines could explain the different degrees of genetic similarity found in these two families; cassava is strongly outcrossing and maintains high levels of heterozygosity. Clusters H, I, and J are made up of Colombian landraces having slightly higher levels of genetic diversity (genetic similarity ranges from 74% to 89%).

Multiple correspondence analysis

The multiple correspondence analysis showed all the accessions as a compact group in which the first three axes explain 19% of the variation (data not shown). Specific bands that distinguished accessions and permitted their simpler classification were not detected. However, in this analysis, one group of accessions differs from the compact, primary one. By excluding the accessions grouped in this latter cluster: (MCOL2261, MCOL647, MBo3, MCOL1522, MCOL2215, and SG638-1), and performing a separate multiple correspondence analysis with the remaining varieties, it was possible to resolve differences among varieties of the primary group. With a cophenetic correlation coefficient value of 0.93, ten well-defined clusters were found (Fig. 3), with varieties grouped on the basis of their distance, reflecting both CBB response (Table 1) and geographic origin. It is noteworthy that some clusters are composed of accessions susceptible to both *Xam* strains (e.g., cluster 3), and others, like

Fig. 1. Example of AFLP autoradiograph obtained using primer combination PE1A * PM1A. Arrows indicate some polymorphic bands among cassava accessions.



cluster 7, are composed of accessions that were either resistant or susceptible to both strains, with only one exception. In some cases accessions coming from the same full-sib family were either located in the same cluster or in a cluster close by (e.g., accessions from CG501 are located in either cluster 1 or 2; Fig. 3). When accessions were plotted on the basis of their resistance or susceptibility to either *Xam* strain or to both, a random distribution was found (data not shown), instead of resistant varieties grouping together, thus confirming our findings with UPGMA. A total heterozygosity index was calculated to find diversity within clusters, as well as among them (Table 2); the genetic differentiation coefficient found was 0.249 suggesting that the diversity within groups is higher than among them.

Discussion

Our results demonstrate that AFLP analysis effectively and efficiently provided quantitative estimates of genetic similarities related to the distribution of variability among cassava accessions. This finding is supported by Roa et al. (1997), who reported similar results using samples from different *Manihot* species. In the scoring of autoradiographs, all

0.7

0.8

0.9

1.0 Accession Cluster

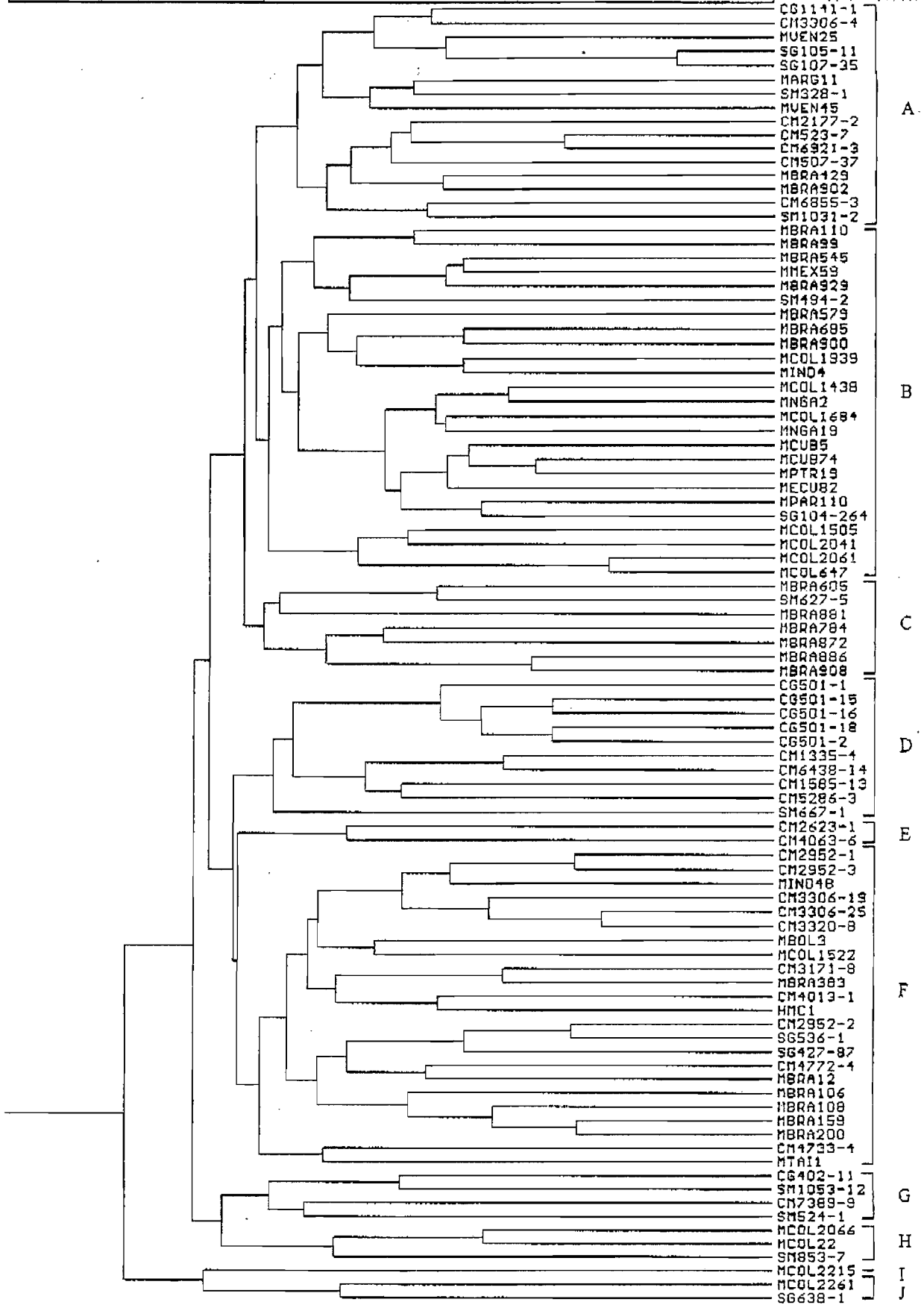
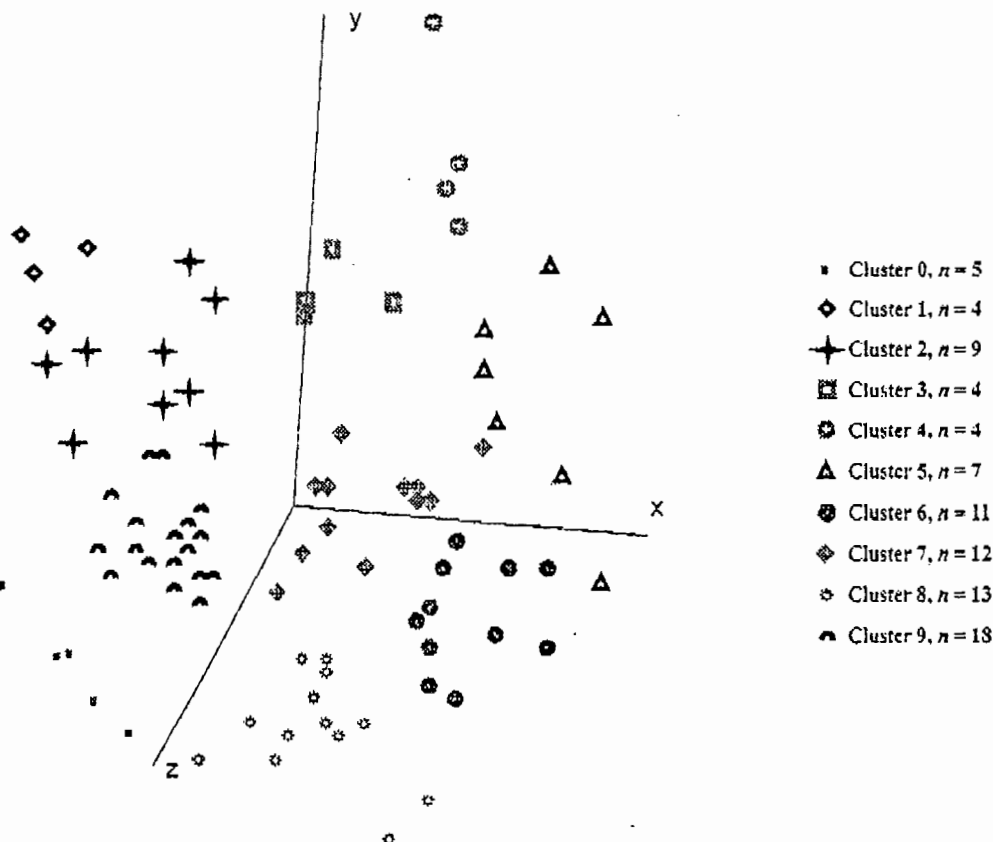


Fig. 2. Phenogram obtained from AFLP data, showing the distribution in 10 clusters (A to J) of 93 cassava accessions. See Table 1 to identify resistant or susceptible accessions.

Fig. 3. Clusters obtained from multiple correspondence analysis. See Table 2 to identify the accession names by cluster.



fragments of the same size in different genotypes were considered to represent the same character. This assumption is difficult to confirm without extensive genetic analysis or hybridisation studies. However, the correspondence of the AFLP data with analyses based on other types of markers indicates that the scoring of multiple fragments as one locus is uncommon (Hill et al. 1996).

AFLP analysis has several advantages over other marker techniques for the analysis of genetic diversity. A major advantage is the short time required to assay large numbers of DNA loci. Compared with RAPD, AFLP analysis detects about 12 times the number of polymorphic loci per assay in soybean varieties (Vogel et al. 1994 cited in Hill et al. 1996; Maughan et al. 1996). AFLP also provides a high number of markers that can be screened per experiment and the results are highly reproducible (Cervera et al. 1996; Majer et al. 1996).

AFLP analysis yielded 20 to 50 bands per individual and per combination (for primer sets PE1A * PM1A and PE1B * PM1D), more than previously reported for RAPD and RFLP data on similar accessions of *M. esculenta* (Bonierbale et al. 1994). We also found a high rate of polymorphism (near 78%) which agrees with previous reports of cassava AFLP studies (M. Fregene, personal communication). AFLP is also more informative than other methods used to date to characterize cassava germplasm such as isoenzymes, RFLPs, and

RAPDs (Beeching et al. 1993; Lefevre and Charrier 1993; Marmey et al. 1994).

One objective in characterising resistance to CBB in source populations is to assess the likely effects of selection for this character on the overall genetic diversity. Genetic advance for traits of primary and secondary importance depends on the identification of recombinant individuals in variable populations that carry favourable alleles from their parents. Because the genetic diversity of a breeding population is reduced by selection, the theoretical rate of gain declines. If a trait has a narrow genetic base, that is, it is present only in closely related individuals, selection for the trait may result in greater reduction of overall diversity. The coefficient of genetic differentiation (Table 2) $G_{st} = 0.249$, clearly shows that the difference between clusters explains 25% of total heterogeneity for this material. A higher diversity was therefore found within clusters than between them. In this case, the value of G_{st} agrees with the multiple correspondence analysis, in which the distance between samples of the same cluster is bigger than between clusters, thus suggesting that the group of accessions chosen is a good representation of the population. Our analysis demonstrates that CBB resistance is present in genetically diverse cassava accessions (represented by groups of individuals, at different branches of the phenogram), as opposed to being concentrated in one or a few "lineages." This suggests that breeding

Table 2. Heterozygosity indices^a for clusters, and total genetic diversity index. Clusters are numbered in accordance with Fig. 3.

Cluster	Hs	Accessions
0	0.165	CM4733-4, MBRA106, MBRA159, MBRA200, MTA11
1	0.118	CG501-15, CG501-18, CG501-2, CM1585-13
2	0.199	CG501-1, CG501-16, CM1335-4, CM3306-19, CM3306-25, CM6438-14, MCOL2066, SM524-1, SM667-1
3	0.197	CG1141-1, CM3306-4, CM7389-9, SM853-7
4	0.169	CG402-11, CM2177-2, MCOL22, SM1053-12
5	0.200	CM507-37, CM523-7, CM6921-3, MBRA429, MBRA605, SM1031-2, SM627-5
6	0.218	MBRA579, MBRA685, MBRA784, MBRA872, MBRA902, MECU82, MNGA19, MNGA2, MPTR19, SG104-264, SG105-11
7	0.217	CM6855-3, MARG11, MBRA886, MCOL1505, MCOL1939, MCOL2041, MCUB5, MIND4, MVEN45, SG107-35, SG427-87, SM328-1
8	0.205	MBRA108, MBRA110, MBRA545, MBRA881, MBRA900, MBRA908, MBRA929, MBRA99, MCOL1438, MCOL1684, MCUB74, MMEX59, MPAR110
9	0.201	CM2623-1, CM2952-1, CM2952-2, CM2952-3, CM3171-8, CM3320-8, CM4013-1, CM4063-6, CM4772-4, CM5286-3, HMC1, MBRA12, MBRA383, MCOL2061, MIND48, MVEN25, SG536-1, SM494-2
A ^b	0.188	MCOL2261, MCOL647, MBOL3, MCOL1522, SG638-1, MCOL2215

Hst	Ht	Gst
0.066	0.263	0.249

Note: Hs represents the heterogeneity within clusters; Hst, heterogeneity among clusters; Ht, total heterogeneity; and Gst, the genetic differentiation coefficient.

^aAccessions in each cluster are stated.

^bA represents the group of accessions eliminated from the data set prior to conducting the second MCA.

for resistance, for example, with the goal of recombining possibly different favourable alleles, will not reduce the overall diversity of the breeding population. If resistant accessions are combined, sufficient variation will likely remain in the population to permit further improvement for additional traits in subsequent cycles of selection and recombination. Our results also reinforce the advantage of using data of a quantitative and additive nature, such as molecular-marker data, in selecting parents for development of breeding populations in an outcrossing species to maximise heterosis.

We also set out to define selection criteria to reduce the number of cassava varieties constituting a set of host differentials, and to establish suitable criteria for selecting or discarding material for further studies. In this analysis we did not observe a single band or a group of bands consistently associated with resistance, which could serve as resistance markers. Nevertheless, on the basis of the present study, it is possible to select a discrete number of accessions for further studies of the host-pathogen interaction. We suggest using the varieties MBra695, MBra881, MBra900, MNGa19, and MVen45 in efforts to improve cassava for resistance to bacterial blight. These accessions have shown the highest resistance to both *Xam* strains. Interestingly, most of them are Brazilian landraces or derivatives, such as MNGa19, which is an improved variety, obtained by crossing a third backcross derivative of *M. glaziovii* to African then to Brazilian landraces. Moreover, most of these varieties are located in different clusters throughout the phenogram. Combining accessions located throughout the phenogram would maximise the chance of maintaining higher diversity, and therefore, the possibility of getting more than one resistance allele in a breeding effort.

We further recommend using varieties CM2177-2, MNGA2, CM523-7, CM6438-14, and MCOL22 that have

shown medium resistance to both *Xam* strains, as well as accessions CM1335-4, MMEX59, and SM1031-2 which are resistant to one strain and highly susceptible to the other, to be tested as host differentials with a wider range of *Xam* strains. Indeed, with these cassava accessions and with more *Xam* strains, it would be possible to test more accurately the resistance response.

The use of the AFLP technology to map resistance loci, and their subsequent cloning, may help us better understand the genetic basis of resistance against pathogens (Cervera et al. 1996). Markers consistently associated with CBB resistance have not yet been found, perhaps because of the limited accessions used and the enzyme combination and primer sets tested. It is also likely that in this diverse set of cassava germplasm, several factors may contribute to the resistance observed, making it unlikely that any one genetic marker would be consistently associated with resistance across accessions. However, with a specific cross between a highly resistant parent and a susceptible one, it should be possible, not just to find specific markers associated with resistance, but also to map the resistance loci (Maugham et al. 1996). Our hypothesis of multiple resistance loci could be tested in this manner, by using a series of genetic stocks.

Further work on cassava bacterial blight could include marker-assisted selection based on the AFLP technique, molecular cloning, and characterisation of resistance gene(s). This may help elucidate the mechanisms and genetics of resistance. Mapping defined traits using selected crosses and the AFLP technique appears to be promising for future studies (Meksem et al. 1995).

Acknowledgements

We acknowledge W.M. Roca (CIAT), J. Tohme, and C. Iglesias for their support. We thank A. Gonzales, B. Pérez,

and J. Valencia for their assistance in the field and greenhouse. We also thank J. Bedoya, F. Calle, and N. Morante for their fruitful discussions. We are grateful to Adriana Bernal for her help with AFLP primer screening. We thank E. de Paéz for editing review. This research was supported by grants from IRD and CIAT and by a fellowship awarded to G. Sánchez by the Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología "Francisco José de Caldas" (Colciencias).

References

- Beeching, J.R., Marmey, P., Gavada, M.C., Noirot, M., Haysom, H.R., Hughes, M.A., and Charrier, A. 1993. An assessment of genetic diversity within a collection of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm using molecular markers. *Ann. Bot.* 72: 515-520.
- Boher, B., and Verdier, V. 1994. Cassava bacterial blight in Africa: The state of knowledge and implications for designing control strategies. *Afr. Crop. Sci. J.* 2: 505-509.
- Bonierbale, M.W., Maya, M.M., Claros, J.L., and Iglesias, C. 1994. Application of molecular markers to describing the genetic structure of cassava gene pools. In *The cassava biotechnology network. Proceedings of the 2nd International Scientific Meeting, Bogor Indonesia, 22-26 August 1994, Vol. I (Working document No. 150). Edited by CBN, Central Research Institute for Food and Crops (CRIFC) of the Agency for Agricultural Research and Development (AARD) and the Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.* pp. 106-112.
- Cervera, M.T., Gusmao, J., Steenackers, M., Peleman, J., Storme, V., Vanden Boerck, A., Van Montagu, M., and Boerjan, W. 1996. Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in *Populus*. *Theor. Appl. Genet.* 93: 733-737.
- Gilbertson, R.L., Rojas, M.M., Russell, D.R., and Maxwell, D.P. 1991. Use of the asymmetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability of bean golden mosaic geminivirus in the Dominican Republic. *J. Gen. Virol.* 72: 2843-2848.
- Hahn, S.K. 1978. Breeding of cassava for resistance to cassava mosaic disease and bacterial blight in Africa. In *Diseases of tropical food crops. Proceedings of the International Symposium of the UCL, Louvain-La-Neuve, Belgium. Edited by H. Maraité and Y.A. Meyer.* pp. 211-219.
- Hahn, S.K., Howland, A.K., and Terry, E.R. 1980. Correlated resistance of cassava to mosaic and bacterial blight diseases. *Euphytica*, 29: 305-311.
- Hill, M., Witsenboer, H., Zabeau, M., Vos, P., Kesseli, R., and Michelmore, R. 1996. PCR-based fingerprinting using AFLPs as tool for studying genetic relationships in *Lactuca* sp. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1202-1210.
- Hongtrakul, V., Huestis, G.M., and Knapp, S.J. 1997. Amplified fragment length polymorphism as a tool for DNA fingerprinting of sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* 95: 400-407.
- Kpémoua, K., Boher, B., Nicole, M., Calatayud, P., and Geiger, J.P. 1996. Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Can. J. Microbiol.* 42: 1131-1143.
- Lefevre, F., and Charrier, A. 1993. Heredity of seventeen isozyme loci in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica*, 66: 171-178.
- Lozada, T. 1990. Cruzamientos dialéticos em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). PhD Thesis, Universidade de São Paulo, Brazil.
- Lozano, J.C. 1975. Bacterial blight of cassava. *PANS (Pest Artic News Samm)*, 21: 38-43.
- Lozano, J.C., and Sequeira, L. 1974. Bacterial blight of cassava in Colombia: Epidemiology and control. *Phytopathology*, 64: 83-88.
- Mackill, D.J., Zhang, Z., Redoña, E.D., and Colowit, P.M. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers on rice. *Genome*, 39: 969-977.
- Majer, D., Mithen, R., Lewis, B., Vos, P., and Oliver, R. 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation fungi. *Mycol. Res.* 100: 1107-1111.
- Maraite, H., and Meyer, J.A. 1975. *Xanthomonas manihotis* (Athaud-Berthet) Strarr, causal agent of bacterial wilt, blight and leaf spots of cassava in Zaire. *PANS (Pest Artic News Samm)*, 21: 27-37.
- Marmey, P., Beeching, J.R., Hamon, S., and Charrier, A. 1994. Evaluation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collections using RAPD markers. *Euphytica*, 74: 203-209.
- Maugham, P.J., Saghai-Mafoof, M.A., Buss, G.R., and Huestis, G.M. 1996. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: Species diversity, inheritance and near-isogenic line analysis. *Theor. Appl. Genet.* 93: 392-401.
- Meksem, K., Leister, D., Peleman, J., Zabeau, S.F., and Gebhardt, C. 1995. A high-resolution map of the vicinity of the R1 locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Mol. Gen. Genet.* 249: 74-81.
- Nei, M. 1975. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70: 3321-3323.
- Nei, M., and Li, W.H. 1979. Mathematical models for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 5268-5273.
- O'Neill, N., Van Berkum, P., Lin, H., Kou, J., Ude, G., Kenworthy W., and Saunders, J. 1997. Application of amplified restriction length polymorphisms for genetic characterization of *Colletotrichum* pathogens of alfalfa. *Phytopathology*, 87: 745-750.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey S., and Rafalski, A. 1996. The utility of RFLP, RAPD, AFLP and SSRP (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2: 225-238.
- Restrepo, S., and Verdier, V. 1997. Geographical differentiation of the population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4427-4434.
- Roa, A.C., Maya, M.M., Duque, M.C., Tohme, J., Allem A.C., and Bonierbale, M.W. 1997. AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. *Theor. Appl. Genet.* 95: 741-750.
- Rohlf, H.J. 1994. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics Inc., New York.
- SAS Institute, Inc. 1989. SAS/IML software: Usage and reference, v. 6, 1st ed. SAS Institute, Inc., Cary, N.C., U.S.A.
- Sharma, S.K., Knox M.R., and Ellis, T.N.H. 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and its comparison with RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 93: 751-758.
- Sneath, P.H.A., and Sokal, R.R. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman Co., San Francisco, California.
- Tohme, J., González, D.O., Beebe S., and Duque, M.C. 1996. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop. Sci.* 36: 1375-1384.

- Umemura, Y., and Kawano, K. 1983. Field assessment and inheritance of resistance to cassava bacterial blight. *Crop. Sci.* 23: 1127-1132.
- Verdier V., Restrepo, S., Boher, B., Nicole, M., Geiger, J.P., Alvarez E., and Bonierbale, M. 1997. Cassava bacterial blight: Recent achievements in understanding the disease. *Afri. J. Root. Tuber Crops*, 2: 64-68.
- Verdier, V., Boher, B., Maraite, H., and Geiger, J.P. 1994. Pathological and molecular characterization of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of cassava (*Manihot esculenta*). *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4478-4486.
- Verdier, V., Dongo, P., and Boher, B., 1993. Assessment of genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2591-2601.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995. AFLP: New technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.

3.3 Caractérisation des pathotypes de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* en Colombie

Characterization of pathotypes among strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. S. Restrepo, G. M. Sánchez, M. C. Duque, V. Verdier. Soumis Plant Disease.

Characterization of Pathotypes among Strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia

S. Restrepo, M. C. Duque, and V. Verdier, Biotechnology Research Unit, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) and Institut de Recherche pour le Développement (IRD), A.A. 6713, Cali, Colombia.

Corresponding author: V. Verdier, Biotechnology Research Unit, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), A.A. 6713, Cali, Colombia; E-mail: V.VERDIER@CGIAR.ORG

ABSTRACT

Restrepo, S., Duque, M.C., and Verdier, V. 1999. Characterization of pathotypes among strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. Plant Dis.

Cassava bacterial blight, caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* is a destructive disease occurring in most cassava growing-areas. Although Colombian strains differ in DNA polymorphism and pathogenicity, no suitable host differentials have been identified to demonstrate physiological specialization. A set of strains from three edaphoclimatic zones (ECZs) in Colombia was selected for inoculation on a set of 17 potential cassava differentials. Leaf inoculation and stem puncture were used in order to detect possible specific interactions between cultivars and strains. Cultivar \times strain interaction was highly significant ($P < 0.001$) after stem puncture inoculation, but not after leaf inoculation, based on leaf lesion size. Interaction was also highly significant when the area under the disease progress curve (AUDPC) was calculated for inoculated stems. Stem inoculation technique was selected as a method for resistance screening of cassava cultivars for bacterial blight resistance. Different pathotypes were defined for the three ECZs in Colombia. These results should help to better select sources of resistance to cassava bacterial blight.

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a major food crop in the tropics. Cassava bacterial blight (CBB) is a destructive disease in South America and Africa. The causal agent is *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, which can induce a wide variety of symptoms (16). Vauterin et al (27) recently proposed a reclassification of the genus *Xanthomonas*, naming the CBB organism *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. We will use this proposed name. In Colombia, efforts to increase high-yielding cultivars of cassava have been hindered by the susceptibility of several cultivars to CBB (13). The most appropriate and realistic approach for controlling CBB is through host resistance (30). Resistance has been developed from *M. esculenta* and the wild relative *M. glaziovii* and it seems to be polygenic and additively inherited (9). However, no resistance genes have been postulated (30). A recent study showed that resistance is found in a genetically broad range of cassava accessions and is not limited to one or a few “lineages” of the host (21). *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* is a foliar and a vascular pathogen. No mechanism has been observed to limit bacterial development in resistant cultivars during the foliar phase and intercellular multiplication in the mesophyll (4). Defense mechanisms deployed by cassava plants against the pathogen were evidenced in the vascular system (12).

Effective breeding for resistance requires information on pathogen diversity and geographical distribution. Considerable variation has been observed among *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* strains in relation to biochemical and physiological characters (7, 8), serology (32), and genomic characters as analyzed through restriction fragment length polymorphism (RFLP) (19, 29, 31) or amplified fragment length polymorphism (AFLP) techniques (18). Recent studies detected a high level of DNA polymorphism in strains from South America (19, 31). In Colombia, strains collected from three ecological zones (ECZ) were analyzed and showed geographical differentiation (19).

Differences in virulence among *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* strains were first described by Robbs et al. (20), and also described for strains in Zaire (14). Fifty-two strains collected in Colombia from different locations and inoculated onto three cultivars were grouped into four levels of pathogenicity (3). Virulence variation was also observed among strains from Brazil (1, 26) and Africa (7, 8). Strains also showed differences in the speed of symptom development, suggesting variation in aggressiveness (28, 29). Mutations to increased virulence are considered to occur readily among *Xanthomonas* spp. (25), and probably explain the occurrence of CBB epidemics in several cassava-growing regions (32). Other results suggested

that a strain \times cultivar interaction also exists (14, 15). However, a larger number of cultivars and a wider range of strains should be evaluated to confirm these results (15). A clear-cut classification by race is difficult because of the lack of host differentials and insufficient knowledge of genetics of resistance to CBB. More recently, 10 pathotypes were defined among 91 *Xanthomonas axonopodis* sp. *manihotis* strains in Venezuela, using five cassava cultivars as differentials (31).

The objectives of the present study are to (1) develop an inoculation method for detecting strain \times cultivar interactions, (2) determine the possible existence of pathotypes, and (3) assess the selected cassava cultivars for their usefulness as host differentials.

MATERIALS AND METHODS

Cassava cultivars. Based on a previous study (21), we selected 17 cultivars from the cassava germplasm collection at CIAT as potential host differentials for CBB. They were chosen for their different geographical origins and adaptability to the biotic and abiotic constraints in the main edaphoclimatic zones (ECZs) where cassava is cultivated. Cassava accessions were codified as follows: CG (cassava genetics program, controlled cross) and CM, (cassava improvement program, controlled cross). Landraces were codified by country of origin (MVEN = Venezuela; MCOL = Colombia; MBRA = Brazil; MNGA = Nigeria). Four cultivars, CM 2177-2, CM 523-7, MCOL 22, and MNGA 2, were selected to compare leaf and stem inoculations. The stem inoculation experiment was extended to 13 additional cultivars.

Bacterial strains and inoculation techniques. Twenty-six strains, representing the 26 RFLP haplotypes described in Colombia in 1996 (19), were used for inoculation. These 26 haplotypes belong to different genetic groups having distinct RFLP patterns, using the *pthB* gene as probe (19). For long-term storage, strains were stored on glycerol (60%) at -80°C . Strains were plated on YPG medium (5 g l^{-1} yeast extract, 5 g l^{-1} peptone, 5 g l^{-1} glucose 5 g l^{-1} and 15 g l^{-1} agar), 12 h before used for inoculation. Inoculations were conducted in a greenhouse at $28/19^{\circ}\text{C}$ (day/night temperatures), under a 12-h day light photoperiod and 80% relative humidity. The cassava plants were grown from mature stem cuttings in sterile soil. All plants were one-month old for the leaf and stem inoculation experiments.

Leaf inoculation. Leaves were inoculated by placing $10\mu\text{l}$ of a bacterial suspension (10^8 CFU ml^{-1}), in a small hole (diameter; 2 mm) previously punched out with a cork borer. Leaves

were treated with sterile water as control. Angular leaf spots around the hole were observed 7 days after inoculation. Three plants were used and for each, two leaves (third and fourth leaf from the apex) were inoculated. For each cultivar x strain combination, the average size of six lesions was estimated by scanning the lesions with a video system (Stratagene) and calculating the area with the Sci-scan software (Delta-T SCAN Devices) (6, 11).

Stem inoculation. Five plants (i. e. five replicates) per treatment were inoculated. Each treatment consisted of one strain (i.e. 26 treatments). Cassava plants were inoculated by puncturing the stem between the third and fourth leaf from the top with a toothpick contaminated by passing through a 24-h-old culture. Plants were arranged in the greenhouse according to a randomized complete block design in five replicates. Non-inoculated plants were included in each experiment as control. The experiment was conducted twice and to compare both experiments, a correlation coefficient was calculated between each treatment. Symptoms were monitored at 7, 14, and 30 days after inoculation, with the observed reactions rated on the following scale: 0 = healthy plant, no reaction observed; 1 = dark area or necrosis around the inoculation point; 2 = gum exudation on stem and petioles; 3 = wilting of one or two leaves and exudation; 4 = more than two leaves wilted; and 5 = complete wilting and dieback. Plants with a mean disease reaction of ≤ 3 were grouped as resistant, while those with a disease reaction of > 3 were classified as susceptible (31). In this study, “virulence” refers to the ability of a strain to infect a host and, usually, to reproduce on it (2). “Pathotype” is a group of strains sharing a common phenotype of virulence to a set of host cultivars (5). “Aggressiveness” refers to the severity of disease induced by a strain for a particular host-pathogen interaction (2).

Statistical analysis. In the stem puncture experiment of 17 cultivars with 26 strains, data after 30 days were analyzed by the Kruskal-Wallis nonparametric variance analysis PROC NPAR1WAY (SAS Institute Inc., Cary, N.C.) (22, 23). The area under disease progress curve (AUDPC) permits estimating the aggressiveness of strains and evaluating the type of interactions between cassava and strains. The AUDPC was calculated with data from the stem puncture at 7, 15, and 30 days after inoculation for each cultivar-strain combination (24) as follows:

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^3 ((D_i + D_{i-1}) * (t_i - t_{i-1})) / 2$$

where D is the disease score using the 0-5 severity scale, and

t corresponds to days after inoculation.

The AUDPC was calculated for each plant before being averaged over all replicates. The resulting AUDPCs were log transformed before analysis. The AUDPCs and disease severity were analyzed, using SAS General Linear Models procedure PROC GLM. To assess differences among strains, cultivars, and their interactions, Duncan's multiple range test was used to compare means ($P < 0.05$). Spearman's rank correlation was used to compare stem with leaf inoculations.

RESULTS

Comparison of leaf and stem inoculations. Average size of leaf lesion varied widely among cultivars. The smallest leaf lesions occurred in cultivar CM 2177-2, and the largest in cultivars CM 523-7, MNGA 2 and MCOL 22 (Table 1). Mean size of leaf lesion for cultivar CM 2177-2 was 18 mm^2 (± 1.6), for CM 523-7, 45.4 mm^2 (± 3.2), for MNGA 2, 38.3 mm^2 (± 4.6), and for MCOL 22, 36.4 mm^2 (± 2.7) (Table 1). Within each cultivar, average lesion size also varied. Lesion sizes ranged between 11.7 and 31.4 mm^2 on CM 2177-2, between 28.3 and 58.7 mm^2 on CM 523-7, between 19.9 and 61.3 mm^2 on MNGA 2, and between 17.5 and 49.1 mm^2 on MCOL 22 (Table 1).

The Kruskal-Wallis test performed on stem reaction data showed highly significant strain \times cultivar interaction ($P < 0.001$) (Table 2). In contrast, the leaf inoculation method did not produce significant cultivar \times strain interaction ($P = 0.1884$). Spearman's rank correlation coefficient test showed that the reactions induced by strains were significantly different according to leaf and stem inoculation.

Strain \times cultivar interactions. *Stem inoculation.* A high correlation coefficient was found when comparing the two experiments ($r = 0.8$). In consequence, for analysing the stem data, the average of ten replicates was used. Interactions between strains and cassava genotypes were highly significant ($P < 0.001$). Each strain showed a different virulence pattern after inoculation on the 17 cultivars, indicating that 26 different pathotypes could be defined among the 26 strains used. Although discrete virulence groups could not be identified using the 17 cassava cultivars, some differential reactions were detected (Table 2).

According to results of the stem inoculation, MBRA 886, MBRA 685, MNGA 2, and CM 6438-14 were the most resistant cultivars but resistance was incomplete. CM 2177-2 and MCOL

2261 were clearly the most susceptible cultivars, and the remaining cultivars showed a broad range of reactions (Table 2).

Strains appeared to differ in aggressiveness, with CIO 12, CIO 22, CIO 40, and CIO 46 being the most aggressive and having a mean disease index (average of stem puncture reactions across all cultivars) above 4.2. Strain CIO-90 was the least aggressive with a mean disease index of 2.0. The average aggressiveness of strains also differed according to the ECZ of origin. The three strains from ECZ 5 and the 15 from ECZ 2 were highly aggressive, whereas the eight from ECZ 1 were the least aggressive across the 17 cultivars (Table 2). In terms of virulence, measured as the number of cultivars showing a resistant reaction to a particular strain, the reaction of the different strains also varied greatly. ECZ 1 strains were the least virulent. Strain CIO 46 was the most virulent, and no cultivars showed a resistance reaction to this strain (Fig. 1).

Interactions between strains and cultivars adapted to the ECZ of origin were studied (Table 3). Among the ECZ 1 strains, six different pathotypes were defined according to the reactions of six cultivars adapted to this ECZ (Table 3). In ECZ 2, eight pathotypes were characterized from five cultivars, and only one pathotype was defined for ECZ 5 from three cultivars adapted to ECZ 5 (Table 3).

Area under disease progress curve (AUDPC). The AUDPC was higher when MCOL 2261 was inoculated with CIO 168, CIO 136, CIO 12, and CIO 22, confirming the susceptibility of this cultivar. Between the highest value ($\log(\text{AUDPC}) = 4.515$), obtained for MCOL 2261 and strain CIO 168, and the lowest one ($\log(\text{AUDPC}) = 1.93$), obtained for CM 6438-14 and strain CIO 24, a continuum of values was observed, showing reaction diversity between strains and cassava cultivars (data not shown). An analysis of variance (ANOVA) of the AUDPCs indicated significant differences between cultivars, strains, and their interaction ($P < 0.001$) (Table 4). The ANOVA also showed significant differences when strains of the three ECZs were separated ($P < 0.05$) (Table 4). A Duncan test showed that no significant difference was observed between ECZs 2 and 5, whereas strains collected in ECZ 1 differed significantly in their reaction response from strains collected in other ECZs.

To compare AUDPCs, leaf inoculation, and stem puncture after 30 days strains were ranked according to aggressiveness on the four cultivars that were selected for the leaf inoculation test. Correlation was high for the AUDPC and stem puncture at 30 days ($r = 0.90$),

but not significant when comparing leaf inoculation with the other two measures of strain aggressiveness.

DISCUSSION

The present study analyzed host-pathogen interactions within a wide range of Colombian *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* strains and cassava cultivars. Two inoculation methods were assessed. Although we did not compare the leaf and stem reactions for all 17 cultivars, the information we obtained on the subset of four cultivars showed that leaf reactions were not correlated with resistance as measured by stem reaction. Therefore, stem inoculation technique is recommended to rapidly and efficiently screen for resistance and to detect strain × cultivar interactions. Plant defense mechanisms have been extensively studied, including the wide range of mechanisms involved during infection by the pathogen (12). Parenchyma cells in phloem or adjacent to xylem play an important role in resistance, synthesizing callose and phenolic compounds, including lignin (12). Moreover, bacterial lysis pockets in the xylem limit or stop bacterial blight extension (12).

Xanthomonas axonopodis pv. *manihotis* strains were grouped into distinct pathotypes according to the ECZ where they were collected. The geographical differentiation of pathogenic behavior of strains at the ECZ level confirmed our previous observations at the DNA level (19). Using one strain per haplotype group for detecting strain × cultivar interactions has been recommended (19) and proved useful in characterizing pathotypes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (31 and this study). To screen promising cassava cultivars for release in a specific ECZ, we recommend using strains that represent the different pathotypes characterized.

AUDPC has the advantage of quantifying the resistance of the cultivars, the aggressiveness of the isolates and the interactions. The AUDPC also proved a reliable disease index for measuring disease progress in the vascular system where defense mechanisms are present and for selection of resistant entries (10). The AUDPC results permitted to perform a complete variance analysis. The AUDPC data not only showed the existence of specific strain × cultivar interactions but also established the geographical differentiation of the strains' aggressiveness.

Recently, by studying the interaction of 28 Venezuelan *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* strains with a set of five cultivars, 10 pathotypes were described (31). Four of these cultivars (MNGA 2, CM 523-7, CM 2177-2, and MCOL 22) were also used in our study. They

proved useful host differentials, and permitted the identification of pathotypes in ECZs 1 and 2 in Colombia (this study) and in ECZ 1-2 in Venezuela (31). As pointed out by Mew (17), applying a single differential system to tally the pathotypes of pathogens present in highly diverse agroecosystems is very difficult. We therefore recommend the establishment of a differential host system adapted to each ECZ.

Our results can also provide a basis to recommend some cultivars for developing new crosses and thus generating progenies with broader disease resistance. Cultivars MBRA 685, MNGA 2, and MBRA 12 showed a high level of resistance to most of the ECZ 1 pathotypes. Cultivar CM6438-14 and CM 523-7 showed resistance to four of the eight pathotypes defined in the ECZ2. Cultivars resistant to the ECZ 5 pathotypes have not yet been characterized. The high level of aggressiveness showed by the ECZ 5 strains suggests a need for characterizing more suitable sources of resistance.

Based on this work, we are now evaluating germplasm evaluations for CBB in the field for each ECZ. Data are being collected over two consecutive cycles of the crop, and the pathotypic and haplotypic structure of the pathogen population is being monitored. These activities will let us compare the levels of resistance observed under field and controlled conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank B. Boher, C. Bragard, F. Correa and E. Duvellier for their helpful comments on the first draft of the manuscript. We thank M. Levy for his helpful suggestions in analyzing the data and interpreting results. We gratefully acknowledge W. Roca (CIAT) , J.Tohme, C.Iglesias and E. Alvarez for their support. We thank A. González, J. Valencia, and B. Pérez for their help in greenhouse experiments. We also thank E. de Páez for editing. This research was supported by grants from IRD and CIAT and by a doctoral fellowship awarded to S. Restrepo by IRD.

LITERATURE CITED

1. Alves, M. L. B., and Takatsu, A. 1984. Variabilidade em *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Fitopatol. Brasil. 9:485-494.
2. Andrivon, D. 1993. Nomenclature for pathogenic and virulence: The need for precision. Phytopathology 83(9):889-890.
3. Anonymous. 1987. Variabilidad patogénica de *Xanthomonas manihotis*. Annual Report. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
4. Boher, B., and Verdier, V. 1995. Cassava bacterial blight in Africa: The state of knowledge and implications for designing control strategies. Afr. Crop Sci. J. 2:1-5.
5. Caten, C. E. 1987. The concept of race in plant pathology. Pages 21-37 in: Populations of Plant Pathogens: Their Dynamics and Genetics. M. S. Wolfe and C. E. Caten, eds. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
6. Delta-T SCAN Devices, Ltd. 1993. Delta-T SCAN software, version 2.0. Cambridge, England.
7. Fessahaie, A. 1997. Biochemical/physiological characterization and detection methods of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. (Berthet-Bondar) Dye 1978, the causal organism of cassava bacterial blight. Ph. D. Thesis. University of Göttingen, Germany.
8. Grousson, F., Pages, J., and Boher, B. 1990. Etude de la variabilité d'un agent pathogène, *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, par l'analyse factorielle multiple. Agronomie 4:627-640.
9. Hahn, S. K. 1978. Breeding of cassava for resistance to cassava mosaic disease and bacterial blight in Africa. Pages 211-219 in: Diseases of Tropical Food Crops, Proc. International Symposium. H. Maraite and Y. A. Meyer eds. Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium.
10. Johnson, D. A., and Peadar, R. N. 1993. Rust resistance in asparagus F1 hybrid populations. Plant Dis. 77:1144-1148.
11. Kirchhof, G., and Pendar, K. 1993. Delta-T SCAN user manual. N. Webb, ed. Delta-T Scan Devices, Ltd., Cambridge, England.
12. Kpémoua, K., Boher, B., Nicole, M., Calatayud, P., and Geiger, J. P. 1996. Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Can. J. Microbiol. 42:1131-1143.
13. Lozano, J. C. 1986. Cassava bacterial blight: a manageable disease. Plant Dis. 70:1089-1093.

14. Maraite, H., and Meyer, J. 1975. *Xanthomonas manihotis* (Arthaud-Berthet) Starr, causal agent of bacterial wilt, blight and leaf spots of cassava in Zaire. PANS (Pest Artic. News Summ.) 21:27-37.
15. Maraite, H., Weyns, J., Yimkwan, O., Lipembra, P., and Perreux D. 1981. Physiological and pathogenic variations in *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Pages 358-368 in: Plant Pathogenic Bacteria, Proc. of the 5th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. J. C. Lozano and P. Gwin, eds. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
16. Maraite H, 1993. *Xanthomonas campestris* pathovars on cassava, cause of bacterial blight and bacterial necrosis. In: *Xanthomonas*. Pp. 18-24. Swings, J.G., Civerolo, E.L. Eds. London, UK: Chapman and Hall Ltd.
17. Mew, T. W. 1987. Current status and future prospects of research on bacterial blight of rice. Annu. Rev. Phytopathol. 25: 359-82.
18. Restrepo, S., Duque, M. C., Tohme, J., and Verdier, V. 1999. AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. Microbiology 145:107-114.
19. Restrepo, S., and Verdier, V. 1997. Geographical differentiation of the population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. Appl. Environ. Microbiol. 63:4427-4434.
20. Robbs, C. F., de Ribeiro, L. D., Kimura, O., and Akiba, F. 1972. Variações em *Xanthomonas manihotis* (Arthaud- Berthet) Starr. Rev. Soc. Brasil. Fitopatol. 5:67-75.
21. Sánchez, G., Restrepo, S., Duque, M. C., Fregene, M., Bonierbale, M., and Verdier, V. 1999. AFLP assessment of genetic variability in cassava accessions (*Manihot esculenta*) resistant and susceptible to the cassava bacterial blight (CBB). Genome 42:163-172.
22. SAS Institute, Inc. 1989. SAS/IML software: usage and reference, version 6, 1st ed., Cary, N.C.
23. SAS Institute, Inc. 1989. SAS/STAT user's guide, 4th ed., vol. 1, Cary, N.C.
24. Shaner, G., and Finney, R. E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. Phytopathology 67:1051-1056.
25. Stolp, H., Starr, M. P., and Baigent, N. L. 1965. Problems in speciation of phytopathogenic *Pseudomonads* and *Xanthomonads*. Annu. Rev. Phytopathol. 3:231-264.

26. Takatsu, A., Fukuda, S., and Perrin, S. 1978. Epidemiological aspects of bacterial blight of cassava in Brazil. Pages 141-150 in: Diseases of Tropical Food Crops, Proc. International Symposium. H. Maraite and Y. A. Meyer eds. Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium.
27. Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K and Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45(3): 472-489
28. Verdier, V., Boher, B., Maraite, H., and Geiger, J. P. 1994. Pathological and molecular characterization of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of cassava (*Manihot esculenta*). Appl. Environ. Microbiol. 60:4478-4486.
29. Verdier, V., Dongo, P., and Boher, B. 1993. Assessment of genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. J. Gen. Microbiol. 139:2591-2601.
30. Verdier, V., Restrepo, S., Boher, B., Nicole, M., Geiger, J. P., Alvarez, E., and Bonierbale, M. 1997. Cassava bacterial blight: recent achievements in understanding the disease. Afr. J. Root Tuber Crops 2:64-68
31. Verdier, V., Restrepo S., Mosquera, G., Duque, M. C., Gerstl, A., and Laberry, R. 1998. Genetic and pathogenic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Venezuela. Plant Pathol. 47:601-608
32. Wydra, K., Fessehaie, A., Fanou, A., Sikirou, R., Janse, J., Verdier, V., and Rudolph, K. 1998. Variability of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (XCM), incitant of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) bacterial blight, from different geographic origins in pathological, physiological, biochemical and serological characteristics. Proceedings of the 9th International Congress of Plant Pathogenic Bacteria. R. Balasubramanian, D. Lalithakumari, and A. Mahadevan, eds. University of Madras, Madras, India. pp. 317-323

Table 1. Disease reaction (leaf Lesion (mm²)) of four cassava cultivars to 26 *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* strains after leaf inoculation.

ECZ ^a	Strain ^b	Cultivars			
		CM 2177-2	CM 523-7	MNGA 2	MCOL 22
1	CIO-24	16.9 ^c	55.2	33.6	32.7
1	CIO-25	19.7	51.4	37.6	40.6
1	CIO-59	22.3	37.4	31.0	44.2
1	CIO-62	23.2	58.7	41.7	33.0
1	CIO-64	12.8	48.9	61.3	36.7
1	CIO-81	15.4	52.9	20.8	46.9
1	CIO-84	20.3	51.9	41.3	49.1
1	CIO-90	31.4	46.4	19.9	31.7
2	CIO-1	11.7	28.3	22.1	17.5
2	CIO-4	17.8	37.7	40.7	34.1
2	CIO-5	16.8	37.7	40.6	34.7
2	CIO-33	16.8	46.0	38.7	35.0
2	CIO-37	11.9	50.7	48.8	34.6
2	CIO-40	15.9	49.4	31.5	43.0
2	CIO-46	16.4	39.6	54.5	40.0
2	CIO-119	15.9	45.5	46.9	44.7
2	CIO-121	15.9	38.8	34.2	33.8
2	CIO-136	17.1	42.6	33.6	35.7
2	CIO-151	18.4	56.8	59.0	39.0
2	CIO-167	21.7	52.6	28.8	33.4
2	CIO-168	17.9	49.9	32.5	41.1
2	CIO-171	19.3	34.8	35.0	31.2
2	CIO-174	18.8	50.3	54.4	39.4
5	CIO-11	16.8	37.2	25.9	32.0
5	CIO-12	20.2	35.5	31.4	27.3
5	CIO-22	19.0	44.3	50.9	36.6

Mean	18.0 ± 1.6	45.4 ± 3.2	38.3 ± 4.6	36.4 ± 2.7
------	------------	------------	------------	------------

^a ECZ = ecological zones; ECZ1 = subhumid tropics; ECZ2 = acid soil savannas; ECZ5 = high altitude tropics.

^b CIO = CIAT – ORSTOM *Xanthomonas* collection, Biotechnology Research Unit, Cali, Colombia.

^c Number represents the average surface in mm² of six leaf lesions as described in the text.

Table 2. Disease reaction of 17 cassava cultivars to 26 XAM strains. Numbers represent the average disease rating of all replicates

ECZ ^a	Strain ^b	Cultivars																	Mean
		CM 2177-2	CM523-7	MNGA 2	MCOL 22	MCOL1522	MVEN25	MBRA881	MCOL2261	MBRA886	MBRA685	CM5286-3	MCOL1505	CG402-11	MBRA902	CM6438-14	MBRA12	MNGA19	
1	CIO-24	4.7 ^c	2.3	2.7	3.5	4.1	4.4	3.4	4.5	3.2	2.5	3.0	4.6	3.1	5.0	1.3	3.3	3.8	3.5
1	CIO-25	5.0	4.1	2.1	4.0	4.8	5.0	5.0	5.0	2.1	2.4	4.3	5.0	5.0	3.0	3.6	5.0	4.3	4.1
1	CIO-59	5.0	2.9	3.0	3.5	4.4	4.6	3.1	5.0	1.7	2.6	2.8	4.3	5.0	3.0	2.5	3.0	2.9	3.5
1	CIO-62	5.0	3.3	3.0	4.1	4.2	4.4	4.3	5.0	1.5	3.8	2.3	4.6	1.8	4.0	2.0	3.0	3.2	3.5
1	CIO-64	5.0	2.9	3.1	3.8	4.5	4.5	4.3	4.7	1.3	1.6	3.7	3.8	3.9	3.0	4.7	2.8	3.0	3.5
1	CIO-81	5.0	2.8	1.7	4.1	4.7	4.6	4.9	4.1	2.6	2.0	2.8	4.4	4.7	5.0	1.8	2.6	2.5	3.5
1	CIO-84	4.7	2.4	2.0	3.4	4.1	3.0	1.8	5.0	1.1	2.8	3.0	1.8	4.0	2.0	1.0	3.0	1.0	2.7
1	CIO-90	4.0	1.9	1.2	2.2	2.2	2.9	1.6	3.0	1.1	1.1	1.8	2.1	3.4	2.3	1.3	1.0	1.5	2.0
2	CIO-1	5.0	2.9	3.4	4.5	4.8	4.2	4.8	5.0	2.8	4.4	4.4	4.3	4.6	3.0	2.8	5.0	2.8	4.0
2	CIO-4	4.8	3.3	3.1	4.4	4.7	3.8	4.4	4.8	2.0	2.9	2.7	4.3	3.9	3.0	4.0	4.2	3.5	3.7
2	CIO-5	4.8	2.5	2.9	3.8	2.4	3.8	3.6	3.8	3.2	3.1	3.9	3.9	4.1	1.0	1.8	1.0	3.2	3.1
2	CIO-33	3.0	2.8	1.9	3.8	4.0	4.7	3.6	5.0	1.9	3.3	3.3	4.7	4.2	5.0	4.6	1.7	4.3	3.6
2	CIO-37	4.7	3.1	4.1	3.3	3.1	4.4	3.8	4.8	2.2	2.4	4.0	4.0	5.0	4.3	1.8	4.3	3.2	3.7
2	CIO-40	4.2	4.0	3.0	4.6	4.3	4.4	4.6	5.0	3.3	3.6	4.7	4.9	5.0	5.0	3.0	3.8	4.4	4.2
2	CIO-46	5.0	4.8	3.4	4.8	4.4	5.0	4.5	5.0	3.7	3.4	4.2	4.4	4.3	5.0	3.2	3.9	4.5	4.3
2	CIO-119	5.0	4.4	3.8	3.4	4.4	4.4	4.8	5.0	1.9	2.0	4.1	3.8	4.9	2.5	3.0	3.1	3.6	3.8
2	CIO-121	3.8	3.2	2.6	2.8	4.2	4.7	4.0	4.9	2.5	3.3	3.2	2.9	4.8	1.0	2.7	4.4	3.5	3.4
2	CIO-136	4.8	2.8	3.1	4.0	5.0	4.9	3.7	4.8	3.0	1.6	3.2	4.7	4.3	5.0	3.2	3.3	2.8	3.8
2	CIO-151	5.0	2.4	2.8	4.0	4.5	4.9	3.1	2.9	2.6	2.0	2.3	4.8	4.4	4.0	1.0	3.3	3.0	3.3
2	CIO-167	4.9	3.0	3.1	4.7	4.1	5.0	4.6	5.0	5.0	2.9	4.1	4.9	5.0	4.3	2.2	3.5	3.7	4.1
2	CIO-168	5.0	2.7	1.6	4.0	4.8	4.6	3.8	5.0	1.4	2.0	3.8	4.9	5.0	3.7	3.8	4.1	2.3	3.7
2	CIO-171	5.0	3.1	0.9	2.8	4.5	4.6	4.6	4.7	1.2	2.7	4.1	4.4	4.9	4.5	3.8	3.0	3.2	3.6
2	CIO-174	5.0	2.7	2.1	4.3	2.6	3.2	4.3	4.6	2.4	3.2	3.6	3.5	4.6	4.3	3.3	3.9	3.0	3.6
5	CIO-11	5.0	3.4	1.5	5.0	5.0	3.0	4.8	4.8	2.1	1.7	3.6	4.8	4.9	3.7	1.4	3.6	2.8	3.6
5	CIO-12	4.7	2.6	2.6	4.5	4.8	4.5	3.8	5.0	3.7	4.8	4.8	4.8	4.7	5.0	2.4	4.3	4.1	4.2
5	CIO-22	5.0	3.0	4.4	5.0	4.7	4.4	4.8	5.0	5.0	3.4	4.3	4.5	4.8	5.0	1.6	3.0	3.9	4.2
	Mean	4.7	3.1	2.7	3.9	4.2	4.3	4	4.7	2.5	2.8	3.5	4.2	4.4	3.7	2.6	3.4	3.2	

^a ECZ = ecological zones; ECZ1 = subhumid tropics; ECZ2 = acid soil savannas; ECZ5 = high altitude tropics.

^b CIO = CIAT-ORSTOM *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* collection at Biotechnology Research Unit, CIAT, Cali, Colombia.

^c Mean disease index obtained after the inoculation of 10 plants per cultivar X strain combination as described in the text.

Table 3. Pathotypes defined after the analysis of the reactions between strains and cultivars originated from the same ECZ.

ECZ	Pathotypes	Strains	Cassava cultivars					
			MBRA 685	MCOL 22	MVEN 25	MCOL 1505	MBRA 12	MNGA 2
1	C1-1	CIO-59, 81	R ^a	S ^a	S	S	R	R
	C1-2	CIO-24,25	R	S	S	S	S	R
	C1-3	CIO-90	R	R	R	R	R	R
	C1-4	CIO-62	S	S	S	S	R	R
	C1-5	CIO-64	R	S	S	S	R	S
	C1-6	CIO-84	R	S	R	R	R	R
			CM 5286-3	CM 2177-2	MBRA 902	CM 6438-14	CM 523-7	
2	C2-1	CIO-1, 5	S ^a	S	R	R ^a	R	
	C2-2	CIO-37, 40, 167	S	S	S	R	S	
	C2-3	CIO-46, 171	S	S	S	S	S	
	C2-4	CIO-119, 121	S	S	R	R	S	
	C2-5	CIO-136, 168, 174	S	S	S	S	R	
	C2-6	CIO-4	R	S	R	S	S	
	C2-7	CIO-33	S	R	S	S	R	
	C2-8	CIO-151	R	S	S	R	R	
			CG 402-11	MCOL 1522	MCOL 2261			
5	C5-1	CIO-11, 12, 22	S	S	S			

^a R = resistant reaction with mean disease rating less or equal to 3; S = susceptible reaction with mean disease rating greater than 3.

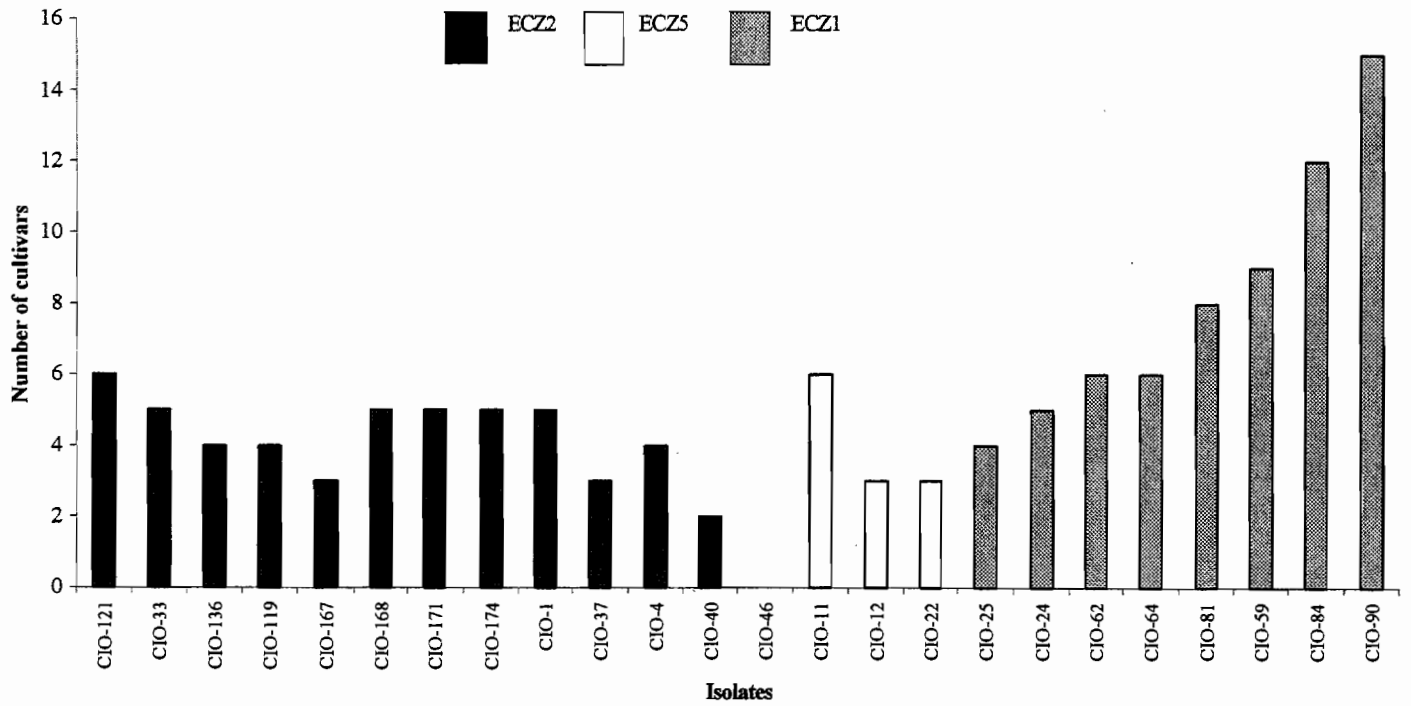
Table 4: Analysis of variance for percent CBB disease incidence data from field experiments of cassava at two different locations in Colombia.

Source	AUDPC ^a			
	df	MS	<i>F</i> value	<i>P</i> > <i>F</i>
Cultivar	16	11.6	27.38	0.0001
Strain	25	4.99	11.79	0.0001
Cultivar X Strain	400	0.61	1.45	0.0001
ECZ ^b	2	0.86	4.97	0.0074

^a Transformed to log(AUDPC).

^b ECZ where strains were collected

Fig.1: Number of cassava cultivars showing a resistant reaction to isolates from three different ECZs. ECZ1 = sub-humid tropics; ECZ2 = acid-soil savannas; ECZ5 = high-altitude tropics.



3.4 **Evaluation de la gamme d'hôte différentielle en champ.**

Resistance spectrum of selected *Manihot esculenta* genotypes under field conditions. S. Restrepo, M.C. Duque and V. Verdier. Soumis Field Crops Research.

Resistance spectrum of selected *Manihot esculenta* genotypes under Field Conditions.

Silvia Restrepo, Myriam C. Duque, Valérie Verdier*

Biotechnology Research Unit, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), and Institut de Recherche pour le Développement (IRD) A.A. 6713, Cali, Colombia. Tel: (572) 445 0037;

Fax (572) 445 0073. E-mail: V.verdier@cgiar.org

*Corresponding author.

Abstract

Resistance to Xanthomonas axonopodis pv. manihotis in some cassava (Manihot esculenta) cultivars was evaluated in two different ecosystems or ECZ (ECZ1, and 2) and during two crop cycles (1997 and 1998) in Colombia where bacterial blight disease is nowadays a threat to cassava production. Except in ECZ1 where climatic conditions were not favorable to disease development in the first crop cycle, almost all plants in the field presented symptoms. However, disease incidence highly depends on the seasonal variations of the climatic conditions. Disease reaction of the different cultivars was compared with previous results obtained under controlled conditions. Correlations between field and greenhouse data varied between years but were relatively low. On the basis of the present study, it is possible to select a discrete number of cultivars in each ecozone in efforts to improve cassava for resistance to bacterial blight.

Key words: Cassava Bacterial Blight; Disease Resistance; Field; Ecological Zone

1. Introduction

Cassava Bacterial Blight caused by Xanthomonas axonopodis pv. manihotis has been considered a threat to cassava production in many countries (Lozano, 1986; Boher and Verdier, 1995). Symptoms are characterized by angular leaf spots and systemic infection of the stem that lead to wilting and dieback. The infection starts with an epiphytic phase of the pathogen on leaves (Daniel and Boher, 1985). This first stage of infection contributes to a buildup of inoculum sufficient to increase significantly the probability of further infection through stomata and wounds (Verdier et al., 1990). The bacteria colonise the intercellular spaces in the leaf mesophyll and multiply rapidly producing large quantities of exopolysaccharide matrix. Leaf blight symptoms can occur as a result of a toxin produced by Xam (Perreux, 1982). Bacteria enter the xylem vessels by lysis of the cell wall and multiply rapidly in the vascular system, spreading and extending to all parts of the plant. Climatic conditions, and in a major degree temperature and rainfall are correlated with the occurrence and severity of CBB (Takatsu et al., 1978). A long rainy season alternating heavy rainfall and hot and sunny days enhances the expression of the disease (Boher and Verdier, 1995). In the absence of rainfall, the parasite stops spreading in the tissues and the epiphytic populations disappear. The parasite can survive in stem tissues and in plant debris but not in the soil (Daniel and Boher, 1985). Rain-splash-dispersal of the bacteria enhances the contamination from plant to plant (Lozano and Sequeira, 1974).

Losses due to CBB can be reduced by a combination of cultural practices, sanitation measures and the use of varietal resistance (Lozano, 1986; Boher and Verdier, 1995). Nowadays, breeding for resistance is the most appropriate and realistic approach to control CBB (Lozano, 1986). The presence of highly aggressive strains in each region where cassava is cultivated highlights the need of a durable varietal resistance (Fessehaie, 1997; Wydra et al., 1998).

The cassava breeding program is based on improving varieties in each specific ecozone (ECZ) for major agronomic traits such as resistance to diseases (CIAT, 1983). The ECZs were defined according to the importance of the agroecosystem for cassava production, climatic conditions, predominant soil type, and pest and disease constraints (CIAT, 1983). Seven zones were defined; these are ECZ 1 = subhumid tropics; ECZ 2 = acid soil savannas; ECZ 3 = humid tropical lowlands; ECZ 4 = mid-altitude tropics; ECZ 5 = high altitude tropics; ECZ 6 = subtropics; ECZ 7 = semiarid. In Colombia, CBB is endemic in the ECZ1 and 2 causing severe epidemics during the rainy season (CIAT, 1979; CIAT, 1980; Verdier and Restrepo, 1997). An efficient and reliable disease screening procedure is a prerequisite for any resistance breeding program. Both

greenhouse and field screening procedures have been developed for the study of cassava ~~X~~Kam interaction (Chalfoun and Tanaka, 1982; Hahn, 1978; Lozano and Laberry, 1982; Perim et al., 1980; Umemura and Kawano, 1983). Genetics of resistance to CBB have never been extensively studied in cassava, with the consequence that no genes governing resistance have been documented for this crop. The resistance is thought to be polygenic and additively inherited. On the other hand, information on the pathogenic and genetic diversity of the pathogen is a prerequisite for selecting disease resistance sources for crop breeding. The study of ~~o~~Kam genetic diversity showed a geographical differentiation of the pathogen in Colombia (Restrepo and Verdier, 1997). A large set of varieties were assessed by AFLPs for genetic diversity and for resistance to CBB (Sanchez et al, 1999). This study helped to select a set of host differentials that were used in studying the cultivar - strain interaction (Restrepo et al., unpublished).

Our main objective is to assess the disease resistance level of the same set of cultivars in the field and in their respective ecozone (1 and 2). We also determine the correlation between field and greenhouse evaluations.

2. Materials and Methods

2.1. Cultivars and Field locations

Cultivars planted consecutively for two crop cycles (in 1997 and 1998) are listed in Table 1. Their ECZ of adaptation appear in Table 1. The evaluation sites were Pivijay (ECZ1) and Villavicencio (ECZ2). Minimum and maximum temperature (C) and rainfall (mm) were monitored each month during the 2 cycles of evaluation. Differences between the maximum and minimum temperatures were calculated for each month.

2.2 Experimental design

In all locations cultivars were planted in rows of six cuttings replicated three times at random in the field. Individuals were planted at every 50 cm in rows separated by 90 cm. Planting material was multiplied at CIAT (Palmira, Colombia), a CBB-free area, by planting 30 stakes, 20 cm long for each cultivar. In each field a susceptible cultivar (control) was planted every 10 rows (MCOLE 2215 in ECZ1, MCUB 74 in ECZ2). In ECZ 1 susceptible borders were also planted around the field. Plantations were realized in May.

2.3 Disease evaluations

All the experiments were subjected to natural inoculum of the CBB pathogen. Evaluations were realized at 4 and 7 months after planting in ECZs 1 and 2. Symptoms were rated as follows. 1 = no symptoms; 2 = presence of angular leaf spots; 3= leaf wilt and exudates; 4 = partial dieback, some apex are entirely affected but others remain symptomless; 5 = complete dieback. Plants with a mean disease reaction of ≤ 3 were grouped as resistant, while those with a disease reaction of > 3 were classified as susceptible. Reactions were averaged for all replications for each evaluation (one average at 4 months and another at 7 months after planting). At each evaluation the percentage of contaminated plants in the field (plants showing a disease reaction of ≥ 2) was estimated.

2.4 Data analysis

Disease incidence (DI) was calculated using the formula: $DI (\%) = (\text{number of plants showing a reaction } \geq 3 \text{ in a sample}) / (\text{total number of plants in a sample}) \times 100$ (Bansalet al., 1994). The data from each replicate were pooled to obtain a mean value for each genotype tested. Disease severity (DS) was calculated using the formula: $(DS) (\%) = \sum (\text{number of plants in a disease scale category} \times \text{disease scale category}) / (\text{total number of plants} \times \text{maximum disease scale category}) \times 100$ (Bansal et al., 1994).

The reaction of cultivars under greenhouse conditions were estimated using DS index from results obtained in a previous study (Restrepo et al., unpublished).

Analyses of variance were performed on arcsine-transformed percent disease severity and percent disease incidence data from the field using the GLM procedure from SAS (SAS, 1989). Sources of variance were the crop cycles (1997 and 1998), the replications, the genotypes, and the interactions between them. Correlations coefficients from field data were calculated between DS and DI values and also from DI with field and greenhouse data for each cycle and each ECZ.

3. Results

In ECZ2 four months after plantation, almost all plants presented symptoms of the disease (Table1), suggesting that the inoculum was homogeneously distributed in the field. On the contrary, in ECZ1 in the first cycle, a very low percentage of plants showed symptoms. These raise the importance of the climatic conditions on the expression of symptom development. In ECZ1, rainfall was particularly low in 1997. Fig. 1A consequence of the "El Niño" phenomenon. In ECZ2, rainfalls as well as differences between maximum and minimum

temperatures were very similar in 1997 and 1998. Fig. 1B and 1C. The incidence of the disease in each ECZ was also estimated by measuring the disease reaction and the DI index of the susceptible control in each ECZ (Tables 1 and 2). For example MCUB74 the susceptible control used in the ECZ2, showed a high disease incidence index (Table 2).

The resistance of cassava cultivars was evaluated by rating the disease reaction on a 1-5 severity scale. Mean disease reactions and the respective resistant (R) or susceptible (S) reaction appear in Table 1. All the controls showed a susceptible reaction, except MCOL 2215 in ECZ1 in the first cycle (Table 1). When mean reactions were considered, all cultivars showed a note < 3 in the first evaluation (4 months after planting) and in the two ECZs. Disease reactions varied among the two crop cycles with some cultivars showing alternatively a resistant or susceptible response. In the ECZ2, some cultivars showed more resistant reactions in the second crop cycle than in the first one.

The resistance reaction of cassava cultivar was also measured by calculating the disease incidence (percentage of plants showing a susceptible reaction per cultivar) (Table 2). In ECZ2, the DI index of the cultivars varied greatly from one cycle to the other. With few exceptions the disease incidence index was lower in the second crop cycle (Table 2).

The percent disease incidence data was also used to study variation among cultivars, cycles, evaluations and the interactions. The analysis of variance for ECZs 1 and 2 appears in Table 3. F values were significant for cultivars which suggest that each cultivar differed from each other and could be differentiated into resistant and susceptible. The evaluations were also significantly different for each ECZs. In ECZ1 the disease incidence was not significantly different in the first and second crop cycles whereas in ECZ2 it was significantly different in 1997 and 1998. However, the combination cycle X cultivar was significantly different suggesting that reaction to the disease varied among cultivars from one cycle to the other.

The disease severity index (DS) data was used to compare results obtained in different cycles for each ECZ and under field and greenhouse conditions. In ECZ1, results obtained in the two cycles did not correlate well. On the contrary, in ECZ2 the correlation coefficient was high when comparing results obtained in the first and second cycle. The coefficients of correlation between disease incidence (DI) and disease severity (DS) data under field conditions and DS index between greenhouse and field data are presented in Table 4. DI and DS data in the field correlated well (Table 4).

Field data were compared with the greenhouse data when cultivars were inoculated with the Xam strains collected in the ECZ of cultivar's adaptation (Table 1). In general, cultivars showed more susceptible reactions when evaluated under controlled conditions (Table 1). In ECZ1 and 2, all the cultivars that showed a resistant reaction in greenhouse were also resistant to the disease in the field. Low correlation coefficients were obtained for cultivars in ECZ1. Therefore, the disease incidence was extremely low in this ECZ.

4. Discussion

Differences among cassava cultivars in relation with disease incidence were found under field conditions at ECZs 1 and 2 and they could be grouped as resistant or susceptible. Some cultivars showed a good level of resistance in their respective ECZ which was correlated with previous results obtained under greenhouse conditions. On the basis of the present study it is possible to select some cultivars to enhance resistance level in further breeding schemes. For example cultivars CM 6438-14 (ECZ 2), MNGA2 (ECZ1), MBRA685 (ECZ1), which showed a high level of resistance both under field and controlled conditions, could be recommended for developing new crosses.

Disease incidence and disease severity indexes were used to provide quantitative information on bacterial blight development and to assess host resistance in the field. The correlation between disease incidence index and disease severity indexes suggest the potential use of both indexes as estimators of the disease development in the field. The disease incidence index resulting from the second evaluation was considered to represent the summation of host-pathogen-environment interactions during the two crop cycles.

Screening for resistance under controlled conditions could facilitate the selection of resistant cultivars if there is a good correlation between field and greenhouse evaluations. In the present study, a majority of cultivars were more susceptible to CBB under greenhouse conditions than observed in the field. The cultivars that showed a resistant reaction under controlled conditions were also resistant in the field. In greenhouse, conditions are well controlled and favor the infection and colonization of the plant by the pathogen. In ECZ2, a correlation between greenhouse and field experiments was observed in 1997 when the disease pressure was relatively high. Lozano and Laberry (1982) also observed a good correlation between field and greenhouse evaluations in one experimental field (Carimagua, ECZ2). They conducted their experiment by observing the appearance of symptoms in the field under strong parasite pressure for several crop

cycles. The population structure of the pathogen may also influence the host-parasite interaction. The *Xam* strains used for screening in the greenhouse and those prevalent in the field at the time of the infection are different and may influence correlation values.

The disease starts during the rainy season with the establishment of the parasite on foliage (Boher and Verdier, 1995). In the first evaluation (4 months after planting), only leaf symptoms were observed. At that time multiplication of the bacteria combined with lysis of the middle lamella of the host tissue lead to the formation of angular translucent leaf spots (Boher et al., 1995). In the second evaluation (seven months after planting) and under favorable conditions, bacteria have colonized the vascular system of the plant blocking the vessels and causing wilting of leaves and the whole plant. Defense mechanisms of cassava cultivars against *Xam* are displayed in the vascular system (Kpémoua et al., 1996). Therefore and as it was the case, disease resistant reactions can be well observed at 7 months after planting.

Seasonal variations have been shown to influence the expression of resistance to fungal diseases of crop plants (Coakley, 1985; Coakley, 1988; Shaner, 1981) as well as to bacterial disease (Adhikari et al., 1994; Mohiuddin et al., 1977; Tagami and Mizukami, 1962; Takatsu et al., 1978). Temperature and rainfall are the most important factors that affects the severity of bacterial blight of cassava (Lozano, 1986). The effect of environmental differences on bacterial blight development could be detected by comparing disease measurements and disease indexes in the two crop cycles evaluated. Weather conditions were favourable for CBB occurrence in ECZ 2, with high rainfall during the month preceding the evaluation. In ECZ1, conditions were not favorable to the expression of CBB symptoms with low rainfall in the first crop cycle. In ECZ2, weather conditions were very similar in 1997 and 1998. However differences in the disease reactions of the cultivar were observed between the two crop cycles. This could be explained by a change in the composition of the pathogen populations. Appearance of new strains of the pathogen and variation in the frequency of previous characterized strains were detected between 1997 and 1998 (Restrepo et al., unpublished). Artificial inoculation of the plants in the field with well characterized strain has been developed. Hahn et al (1980) proposed to inoculate the plant material by stem puncture but others authors showed that this method was ineffective for screening resistance in the field (Boher, pers. comm.; Valle pers. comm). Spraying a bacterial suspension (10^7 cfu/ml) mixed with sterile sand was developed in Brazil for field screening (Valle, 1990). These methodologies are laborious, moreover they also implicate to collect and characterize the strains before performing the artificial inoculation. Moreover, the inoculation

and bacterial epiphytic installation will strongly depend on the climatic conditions. We strongly recommend to use greenhouse evaluation for a rapid screening for bacterial blight disease resistance and for selecting new sources of resistance among the large collection of cassava germplasm available.

Aknowledgements

We gratefully acknowledge W. Roca for his support. We thank F Calle, J. Bedoya (CIAT , Palmira), J. I. Lenis (CIAT, Pivijay), W. Gaitan (CIAT, Villavicencio) and V. Jorge for their help during the plantations and evaluations. We thank E. de Paez for editing review. This research was supported by grants from IRD and CIAT and by a doctoral fellowship awarded to S. Restrepo by IRD.

References

- Adhikari, T.B., Mew, T.W. and Teng, P.S., 1994. Progress of bacterial blight on rice cultivars carrying different *Xa* genes for resistance in the field. *Plant Dis.*, 78: 73-77.
- Bansal, V.K., Kharbanda, P.D., Strigam, G.R., Thiagarajah, M.R. and Tewari, P., 1994. A comparison of greenhouse and field screening methods for blackleg resistance in doubled haploid lines of *Brassica napus*. *Plant Dis.*, 78: 276-281.
- Boher, B. and Verdier, V., 1995. Cassava bacterial blight in Africa. The state of knowledge and implications for designing control strategies. *Afr. Crop Sci. J.*, 2: 1-5
- Boher, B., Kpemoua, K., Nicole, M., Luisetti, J. and Geiger, J.P., 1995. Ultrastructure of interactions between cassava and *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*; cytochemistry of cellulose and pectin degradation in a susceptible cultivar. *Phytopathology*, 85(7): 777-788.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Annual report 1979. Cali, Colombia.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Annual report 1980. Cali, Colombia.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Annual report 1983. Cali, Colombia.
- Chalfoun, S.M. and Tanaka, M.A.S., 1982. Caracterizacao de variedades regionais de mandioca quanto a resistencia, tolerancia ou susceptibilidade a *Xanthomonas manihotis* (Arthaud Berthet) Starr., em condicoes de casa-de-vegetacao e campo. In: Proj. mandioca; relat. 76/79, 1982. Belo Horizonte, pp. 79-86.
- Coakley, S.M., 1985. Describing and quantifying the environment. *Plant Dis.*, 69: 461-466.
- Coakley, S.M., 1988. Variation in climate and prediction of disease in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 26: 163-181.
- Daniel, J.F. and Boher, B., 1985. Etude des modes de survie de l'agent causal de la bactériose vasculaire du manioc *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Agronomie*, 5: 339-346.
- Fessahaie, A., 1997. Biochemical/physiological characterization and detection methods of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. (Berthet-Bondar) Dye 1978, the causal organism of cassava bacterial blight. Ph. D. Thesis. University of Göttingen, Germany.
- Hahn, S.K., 1978. Breeding of cassava for resistance to cassava mosaic disease and bacterial blight in Africa. In: H. Maraite and Y.A. Meyer (Editors), *Diseases of tropical food crops*. Proc. International Symposium at Université Catholique de Louvain, Louvain La Neuve, Belgium, pp. 211-219.
- Hahn, S.K., Howland, A.K. and Terry, E.R., 1980. Correlated resistance of cassava to mosaic and bacterial blight diseases. *Euphytica*, 29: 305-311.

- Kpémoua, K., Boher, B., Nicole, M., Calatayud, P. and Geiger, J.P., 1996. Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Can. J. Microbiol.*, 42: 1131-1143.
- Leung, H., Nelson, R.J. and Leach, J.E., 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *Adv. plant pathol.*, 10: 157-205.
- Lozano, J.C., 1986. Cassava bacterial blight: a manageable disease. *Plant Dis.*, 70: 1089-1093.
- Lozano, J. C., and L. Sequeira. 1974. Bacterial blight of cassava in Colombia: etiology. *Phytopathology* 64:74-82.
- Lozano, J.C. and Laberry, R., 1982. Screening for resistance to cassava bacterial blight. *Plant Dis.*, 66: 316-318.
- Mohiuddin, M.S., Verma, J.P. and Rao, Y.P., 1977. Development of different phases of bacterial blight of rice in relation to rainy days and rainfall. *Indian Ohytopathol.*, 30: 418-419.
- Perim, S., Takatsu, A. and Fukuda, S., 1980. Triagem de variedades de mandioca visando resistencia a bacteriose. *Fitopatologia Brasileira.*, 5: 21-24.
- Perraux, D., Maraite, H. and Meyer, J.A., 1982. Identification of 3(methylthio) propionic acid as a blight-inducing toxin produced by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* in vitro. *Physiological Plant Pathology*, 20: 313-319
- Poundzou, J., 1987. Contribution à la mise au point de techniques de lutte contre la bactériose vasculaire dans le cadre d'un parc à multiplication végétative de manioc. Mémoire pour l'obtention de diplôme d'ingénieur de développement rural. IDR, Brazzaville, Congo, pp. 62.
- Restrepo, S. and Verdier, V., 1997. Geographical differentiation of the population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:4427-4434.
- Sánchez, G., Restrepo, S., Duque, M.C., Fregene, M., Bonierbale, M. and Verdier, V., 1999. AFLP assessment of genetic variability in cassava accessions (*Manihot esculenta*) resistant and susceptible to the cassava bacterial blight (CBB). *Genome* 42: 163-172.
- Shaner, G., 1981. Effect of environment on fungal leaf blights of small grains. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 19: 273- 296.
- SAS Institute, Inc. 1989. SAS/IML software: usage and reference, version 6, 1st ed. SAS Institute, Inc., Cary, N.C.
- SAS Institute, Inc. 1989. SAS/STAT user's guide, 4th ed. , vol. 1. SAS Institute, Inc., Cary, NC.

- Tagami, Y. and Mizukami, T., 1962. Historical review of the researches on bacterial leaf blight of rice caused by *Xanthomonas oryzae* (Uyeda et Ishiyama) Dowson. Plant Dis. Insect Pests Forecasting Serv. Spec. Rep., 10: 1-112.
- Takatsu, A., Fukuda, S. and Perrin, S., 1978. Epidemiological aspects of bacterial blight of cassava in Brazil. In: H. Maraite and Y. A. Meyer (Editors), Diseases of Tropical Food Crops, Proc. International Symposium. Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium, pp. 141-150.
- Umemura, Y. and Kawano, K., 1983. Field assessment and inheritance of resistance to cassava bacterial blight. Crop Science., 23: 1127-1132.
- Valle, T.L., 1990. Cruzamentos dialélicos em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). PhD Thesis, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Sao Paulo. 180 pp.
- Verdier, V., Schmit, J. and Lemattre, M., 1990. Etude en microscopie électronique à balayage de l'installation de deux souches de *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* sur feuilles de vitroplants de manioc. Agronomie, 2: 93-102.
- Verdier V. and Restrepo, S., 1997. Répartition géographique de la bactériose vasculaire du manioc en Colombie et variabilité de l'agent pathogène. In: CIRAD-SAR (Editors) Les cahiers de recherche et développement. pp.16-26.
- Wydra, K., Fessehaie, A., Fanou, A., Sikirou, R., Janse, J. Verdier, V. and Rudolph, K., 1998. Variability of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (XCM), incitant of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) bacterial blight, from different geographic origins in pathological, physiological, biochemical and serological characteristics. Proceedings of the 9th International Congress of Plant Pathogenic Bacteria. R. Balasubramanian, D. Lalithakumari, and A. Mahadevan, eds. University of Madras, Madras, India. Pp. 317-323.

Table 1

Reaction of cassava cultivars to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. The percentage of plants showing symptoms (plants showing a reaction of ≥ 2) are indicated for each evaluation and each cycle

ECZ ^a	Cultivar	Villavicencio (ECZ2)					Pivijay (ECZ1)				
		Greenhouse	Field				Greenhouse	Field			
			First cycle		Second cycle			First cycle		Second cycle	
			1 ^d	2 ^e	1	2		1	2	1	2
1	MBRA 12	3.5 (S)	1.8	2.9 (R)	2.7	3.9 (S)	3.0 (R)	1.0	1.0	2.0	2.3 (R)
1	MVEN 25	4.4 (S)	2.3	4.3 (S)	2.7	2.9 (R)	4.2 (S)	1.2	1.0	2.6	2.8 (R)
1	MBRA 685	2.9 (R)	2.6	3.5 (S)	2.3	3.8 (S)	2.4 (R)	1.3	1.0	2.1	2.4 (R)
1	MCOL 1505	4.3 (S)	2.6	4.1 (S)	2.6	4.1 (S)	3.8 (S)	1.1	1.0	2.2	2.2 (R)
1	MCOL 2215	-	2.9	4.5 (S)	2.9	3.9 (S)	-	1.8	1.0	2.8	3.7 (S)
1	MNGA 2	2.8 (R)	1.9	4.0 (S)	2.3	2.2 (R)	2.4 (R)	1.0	1.0	2.1	2.9 (R)
1	MCOL22	3.9 (S)	1.7	3.9 (S)	2.0	4.0 (S)	3.6 (S)	1.1	1.0	2.4	3.3 (S)
2	CM 2177-2	4.7 ^b (S ^o)	2.6	3.3 (S)	2.1	2.5 (R)	4.8 (S)	1.0	1.0	2.0	2.4 (R)
2	CM523-7	3.2 (S)	2.1	3.6 (S)	1.9	3.0 (R)	2.8 (R)	1.0	1.0	2.2	2.3 (R)
2	CM 5286-3	3.7 (S)	2.1	3.6 (S)	1.9	2.4 (R)	3.0 (R)	1.0	1.0	2.1	2.0 (R)
2	MBRA 902	3.7 (S)	1.9	3.6 (S)	1.6	3.1 (S)	3.4 (S)	1.2	1.0	2.2	3.0 (R)
2	CM 6438-14	2.9 (R)	2.1	2.5 (R)	2.0	2.5 (R)	2.3 (R)	1.2	1.0	2.0	2.9 (R)
2	MCUB 74	-	2.6	4.5 (S)	2.8	4.3 (S)	-	1.2	1.0	2.6	3.3 (S)
4	MNGA 19	3.4 (S)	1.9	2.9 (R)	1.9	2.9 (R)	2.8 (R)	-	-	2.0	2.8 (R)
5	MCOL 2261	4.7 (S)	2.2	3.9 (S)	-	-	4.5 (S)	1.1	1.0	2.1	4.3 (S)
5	MCOL 1522	4.1 (S)	2.1	4.3 (S)	2.0	5.0 (S)	4.1 (S)	1.1	1.0	2.6	3.0 (R)

5	CG 402-11	4.6 (S)	2.2	3.7 (S)	2.7	3.8 (S)	3.9 (S)	1.1	1.0	2.0	2.5 (R)
6	MBRA 881	4.1 (S)	1.9	4.2 (S)	2.1	3.7 (S)	3.6 (S)	1.1	1.0	2.1	2.2 (R)
6	MBRA 886	2.6 (R)	1.9	3.3 (S)	1.9	2.8 (R)	1.8 (R)	1.1	1.0	2.1	2.3 (R)
% of plants showing symptoms			92	100	98	99		5	0	100	100

^a Edaphoclimatic zone (ECZ) of adaptation of the cultivar; ECZ1 = sub-humid tropics; ECZ2 = acid - soil savannas; ECZ4 = mid-altitude tropics; ECZ5 = high - altitude tropics; ECZ6 = Subtropics.

^b Symptoms observed after greenhouse inoculations were rated on a 0 - 5 scale as previously described (Restrepo *et al.*, unpublished). Results were averaged for a total of 10 plants.

^c In field and greenhouse inoculations, plants with a mean disease reaction of ≤ 3 were grouped as resistant (R), while those with a disease reaction of > 3 were classified as susceptible (S).

^d Evaluation realized 4 months after planting.

^e Evaluation realized 7 months after planting.

Table 2

Mean values for percent CBB disease incidence of cassava cultivars in different field locations

Cultivar	Villavicencio (ECZ2)				Pivijay (ECZ1)			
	1997		1998		1997		1998	
	1	2	1	2	1	2	1	2
CM 2177-2	0.0	43.8	0.0	11.1	0.0	0.0	0.0	0.0
CM 523-7	0.0	61.1	0.0	35.7	0.0	0.0	5.6	5.6
MNGA 2	0.0	82.4	0.0	28.6	0.0	0.0	0.0	20.0
MCOL 22	0.0	75.0	0.0	70.0	0.0	0.0	0.0	47.1
MCOL 1522	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0	17.6	35.3
MVEN25	0.0	94.4	0.0	18.2	0.0	0.0	0.0	5.0
MBRA 881	0.0	100.0	0.0	71.4	0.0	0.0	0.0	0.0
MCOL 2261	0.0	88.9	-	-	0.0	0.0	0.0	75.0
MBRA 886	0.0	41.2	0.0	35.3	0.0	0.0	0.0	0.0
MBRA 685	0.0	66.7	0.0	81.3	0.0	0.0	0.0	0.0
CM 5286-3	0.0	64.7	0.0	11.1	0.0	0.0	0.0	0.0
MCOL 1505	0.0	100.0	0.0	93.3	0.0	0.0	0.0	0.0
CG 402-11	0.0	72.2	0.0	60.0	0.0	0.0	0.0	11.1
MBRA 902	0.0	61.1	0.0	55.6	0.0	0.0	0.0	35.3
CM6438-14	0.0	8.3	0.0	12.5	0.0	0.0	0.0	14.3
MBRA 12	0.0	38.9	0.0	62.5	0.0	0.0	0.0	5.9
MNGA 19	0.0	31.3	0.0	28.6	-	-	0.0	13.3
MCUB 74	0.0	100.0	2.2	94.4	0.0	0.0	5.9	23.5
MCOL 2215	16.7	100.0	0.0	85.7	0.0	0.0	3.0	61.5
Mean	0.9	70.0	0.1	53.1	0.0	0.0	1.7	18.6

Table 3

Analysis of variance for percent CBB disease incidence data from field experiments of cassava at two different locations in Colombia

Source	Disease incidence ^a							
	Pivijay (ECZ1)				Villavicencio (ECZ2)			
	df	MS	<i>F</i> value	<i>P</i> > <i>F</i>	df	MS	<i>F</i> value	<i>P</i> > <i>F</i>
Cultivar	18	0.85	2.07	0.02	18	0.306	3.66	0.0001
Evaluation	1	0.36	10.22	0.002	1	3.5	309.39	0.0001
Cycle	1	0.6	4.16	0.11	1	3.6	23.46	0.0084
Cycle X cultivar	18	0.85	2.07	0.02	18	0.17	2.02	0.025
Cultivar X evaluation	18	0.037	1.05	0.42	18	0.31	3.5	0.0002
Cycle X evaluation	1	0.36	10.22	0.002	1	3.5	40.52	0.0001
Cycle X evaluation X cultivar	18	0.037	1.05	0.42	18	0.17	1.93	0.310

^aTransformed to arcsine of square root of percentage

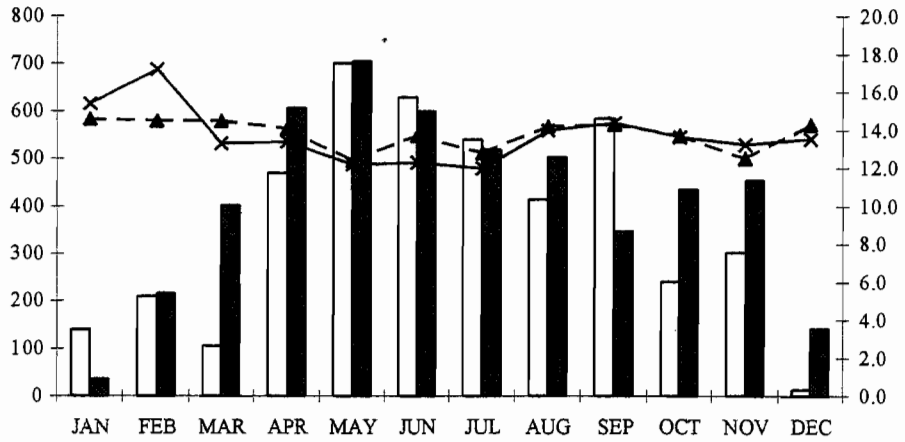
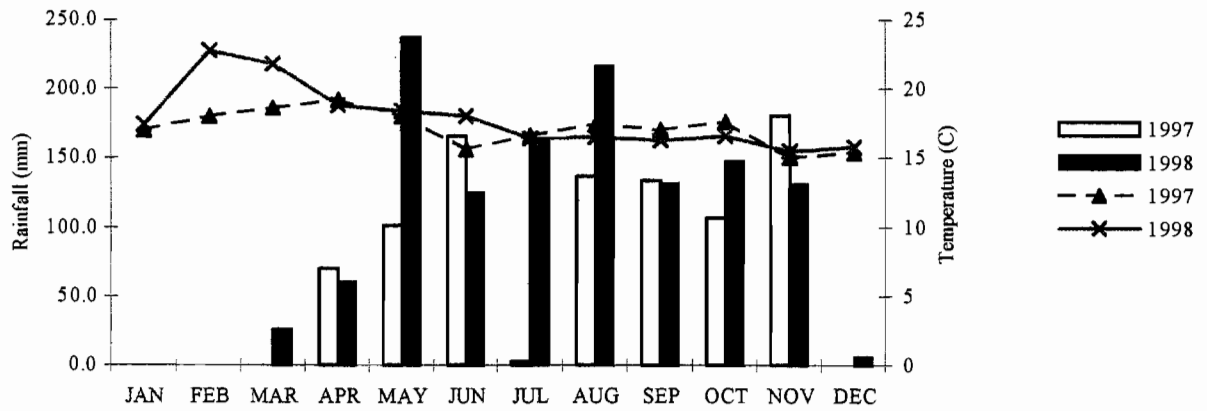
Table 4

Coefficient of correlation (r) among various combinations for percent CBB disease severity data from greenhouse and field experiments.

Combinations ^a	r
DI (field) X DS (field)	0.80
DS (field ECZ1 1997) X DS (field ECZ1 1998)	0.12
DS (field ECZ2 1997) X DS (field ECZ2 1998)	0.60
DS (greenhouse ECZ1) X DS (field ECZ1 1997)	0.16
DS (greenhouse ECZ1) X DS (field ECZ1 1998)	0.31
DS (greenhouse ECZ2) X DS (field ECZ2 1997)	0.44
DS (greenhouse ECZ2) X DS (field ECZ2 1998)	0.31

^a DI (field) = percent disease incidence in field, DS (field) = percent disease severity in the field. DS (greenhouse ECZ) = percent disease severity in greenhouse and inoculations done with isolates collected in different ECZs.

Fig.1. Differences between maximum and minimum temperatures (C) and rainfall (mm) in 1997 and 1998 at (A) Villavicencio (ECZ2), and (B) Pivijay (ECZ1).



3.5 Etude du pouvoir pathogène des souches de l'ECZ5 caractérisées par AFLP

3.5.1 Matériels et méthodes

Les souches utilisées sont originaires de l'ECZ5 (souches: CIO-300, 307, 378, 387 et 390), elles présentent toutes l'haplotype RFLP/pthB C8 et un haplotype AFLP différent (Chapitre 2, paragraphe 2.3). Elles ont été classées dans des sous-groupes UPGMA différents (Chapitre 1).

Les inoculations sont réalisées par piqûre de tige comme décrit précédemment sur des plants âgés d'un mois. Les cultivars choisis sont ceux retenus comme gamme d'hôte différentielle. Les plants sont maintenus en serre à 30°C (±°C) le jour et 26°C (±°C) la nuit avec une humidité relative de 80% (±%).

Les symptômes sont notés 7, 15 et 30 jours après l'inoculation selon une échelle de 0 à 5 où 0 correspond à une plante saine et 5 à une plante totalement flétrie. Un témoin non-inoculé a été inclus pour chaque cultivar. Les plants avec une moyenne inférieure ou égale à 3 sont considérés comme résistants (R) et ceux avec une réaction supérieure à 3 sont considérés sensibles (S). Pour chaque combinaison cultivar - souche, cinq plantes ont été inoculées.

Les données sont transformées en valeur d'aire sous la courbe pour chaque combinaison cultivar - souche. La surface sous la courbe de maladie (AUDPC de l'anglais Area Under Disease Progress Curve) est estimée selon la formule

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^3 ((D_i + D_{i-1}) * (t_i - t_{i-1}))/2 \quad (\text{d'après Shaner et Finney, (204)})$$

où D_i est la catégorie de la maladie (note de l'échelle) à la date t_i . Les données sont transformées en $\log(\text{AUDPC})$ et traitées par analyse de variance (PROC GLM de SAS). Dans le cas où un effet significatif est mis en évidence, les valeurs sont comparées par un test de comparaison de moyennes (test de Duncan avec $p < 0.05$).

3.5.2 Résultats

Les cinq souches ont montré une agressivité élevée sur les différents cultivars avec une moyenne de 4.5. En analysant toutes les interactions souche x cultivar, sans tenir compte de l'ECZ d'origine de la plante hôte, on note que toutes les réactions sont de type sensible à l'exception de le cultivar MCOL22 qui présente une réaction de résistance vis à vis de la souche

CIO 307 (Tableau 7). En considérant seulement l'interaction souche x cultivar par ECZ d'adaptation (ECZ5), un seul pathotype est présent, le pathotype 5-1 préalablement décrit (chapitre 3.3).

Pour le traitement statistique des données, Une analyse de variance est effectuée sur les données de la valeur de la surface sous la courbe de réponse (AUDPC) (Tableau 8). Elle montre qu'il n'existe pas de différence significative entre souches ni entre cultivars. L'interaction souche (ECZ5) x cultivar n'est pas non plus significative suggérant qu'il n'existe pas de spécialisation du pouvoir pathogène au sein des souches collectées dans cette écozone.

3.5.3 Conclusion

La caractérisation des souches *Xam* par AFLP a permis de différencier des sous groupes au sein de la population de l'ECZ5. Les souches représentatives de ces sous groupes ont des caractéristiques de pouvoir pathogène identiques. Notre stratégie n'a pas permis de mettre en évidence de nouveaux pathotypes au sein de cette population. L'agressivité élevée des souches de l'ECZ5 en conditions contrôlées montre combien il est important de développer une résistance stable et durable aux souches présentes dans l'ECZ5.

3.6 Conclusion

Les principales contraintes dans l'amélioration de la résistance du manioc à la bactériose vasculaire sont: le manque d'information sur la variabilité du pathogène et l'absence d'une gamme de cultivars représentatifs de la variabilité existant au sein du genre *Manihot esculenta*. Les souches du pathogène utilisées lors des évaluations pour la résistance ne représentent pas la diversité rencontrée au sein du pathovar *manihotis* (217). Dans ce sens, notre étude apporte une information nouvelle sur la relation hôte-pathogène.

Les cultivars sélectionnés comme gamme d'hôte différentielle ont permis de mettre en évidence des pathotypes différents parmi les 26 souches de *Xam*. La stratégie développée et, qui a consisté en la sélection de 17 cultivars représentatifs des différents clusters AFLP, nous a permis de mettre en évidence des réponses très variables vis à vis des souches de *Xam*. Le choix des cultivars doit se faire en maintenant un niveau de diversité élevé au sein de la gamme hôte et en essayant également de conserver plus d'un allèle de résistance parmi les cultivars choisis.

La mise au point d'un protocole d'infection artificielle est un préliminaire à toute recherche abordant les interactions entre un parasite et son hôte (13). L'inoculation foliaire par blessure circulaire s'avère facile du point de vue technique, économique en matériel végétal et surtout plus proche des conditions naturelles que d'autres techniques comme l'infiltration (13). Cette technique d'inoculation a été utilisée pour la caractérisation rapide de l'agressivité des souches de *Xam* (13, 229). Cependant, nous avons montré qu'en utilisant cette technique, il n'était pas possible de mettre en évidence des interactions différentielles entre souches et les cultivars. Au niveau du mésophylle et dans les premiers stades de l'infection, il n'existe pas de reconnaissance rapide du pathogène et les mécanismes de défense n'interviennent que plus tardivement. L'inoculation par piqûre de tige permet de nous affranchir de l'aspect pénétration dans les tissus, par les voies naturelles ou les blessures et, met en contact la bactérie directement avec le système vasculaire de la plante où les réactions de défense sont exprimées (117). La réponse de la plante à l'infection n'est pas du type tout ou rien et, est codifiée selon une échelle de 0 à 5. Les réactions de résistance et de sensibilité sont ensuite définies selon cette échelle. D'autres mesures comme, l'AUDPC, indices de sévérité et d'incidence, permettent de quantifier et comparer d'une manière plus précise la réaction du cultivar au pathogène. En utilisant des

analyses statistiques appropriées, ces indices permettent d'analyser les interactions en fonction de la souche et du cultivar inoculé.

L'analyse des résultats AUDPC met en évidence la différenciation des souches de *Xam* originaires des trois ECZs (ECZ1, 2 et 5). Il existe une corrélation entre l'origine géographique des souches et les valeurs obtenues par l'analyse AUDPC. L'analyse de la variabilité du pouvoir pathogène confirme les résultats obtenus avec le typage moléculaire. Dans cette étude, les souches ont été sélectionnées selon leur appartenance aux différents groupes RFLP *pthB*. Nos résultats confirment l'intérêt d'utiliser les résultats de l'analyse moléculaire RFLP comme moyens de sélection des souches pour l'étude plus approfondie des interactions souches x cultivars.

L'un des objectifs de cette étude est de mettre en évidence une corrélation entre la caractérisation moléculaire (haplotype) et la caractérisation du pouvoir pathogène (pathotypes). Les résultats acquis dans le chapitre précédent et dans ce chapitre mettent en évidence une différenciation géographique des souches selon leurs caractéristiques génétiques et de pouvoir pathogène. Les pathotypes décrits regroupent des souches représentant des haplotypes différents, suggérant l'évolution convergente de certains haplotypes vers des pathotypes identiques. Néanmoins, l'étude de la corrélation entre phylogénie et pouvoir pathogène doit être élargie. L'étude de l'évolution des pathotypes et l'influence de certains facteurs comme la pression exercée par l'hôte sur les populations du pathogène, restent à élucider.

L'analyse du comportement des cultivars en champ souligne les difficultés liées à l'évaluation en conditions naturelles et, plus particulièrement, les problèmes liés aux changements climatiques. Ceux-ci influent directement sur l'incidence de la maladie. Cela suggère, soit d'avoir recours à l'inoculation artificielle en champ, soit de travailler en condition naturelle dans des conditions optimales d'infection. Les sites d'évaluation doivent présenter une forte incidence de la maladie et également représenter la diversité du pathogène, champs connus en anglais comme "hot-spot" (56). L'évaluation doit se faire sur plusieurs cycles, ce qui impose une contrainte de temps et ne résout pas les problèmes liés aux variations climatiques. Ainsi, Lozano et Laberry (140) suggèrent d'évaluer la résistance variétale pendant cinq cycles successifs de la culture.

Pour évaluer la résistance variétale, la méthode la plus simple, reproductible et peu coûteuse reste l'évaluation en serre, en utilisant les souches représentatives des pathotypes pour

chaque écozone. Pour cela, nous recommandons de suivre l'évolution de la présence et de la fréquence des haplotypes et pathotypes dans le temps.

**4 ANALYSE MICROGEOGRAPHIQUE DE LA DIVERSITE
DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *MANIHOTIS***

4 ANALYSE MICROGÉOGRAPHIQUE DE LA DIVERSITÉ DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *MANIHOTIS*

4.1 Introduction

La stratégie d'échantillonnage dépend étroitement de la répartition géographique de la diversité de l'agent pathogène (130). Dans la plupart des études de variabilité des agents phytopathogènes, un nombre limité de souches est collecté et ce, dans plusieurs localités d'un pays. Cette stratégie d'échantillonnage est appelée macrogéographique et, permet de caractériser la diversité de l'agent pathogène au niveau de grandes zones géographiques (150). Une autre stratégie possible, est celle de collecter un grand nombre d'individus dans des populations individuelles et ce, à un niveau microgéographique. Cette approche d'échantillonnage a été réalisée dans plusieurs études sur la structure de populations de plusieurs agents pathogènes *X. o. pv oryzae*, *Pyricularia grisea* et *Mycosphaerella graminicola* (150, 152, 227, 249). Les informations obtenues peuvent être appliquées au déploiement ou à l'introduction de géotypes résistants. Dans le cas de *Mycosphaerella graminicola*, les résultats d'une analyse microgéographique de la diversité ont montré, qu'au sein de la population étudiée, la diversité était élevée et distribuée à très petite échelle (152). Par conséquent les géotypes résistants doivent être introduits aussi à petite échelle et, en utilisant des mélanges de cultivars ou des multilignées (150, 245).

Dans une première étude, la stratégie d'échantillonnage des souches de *Xam* a été faite au niveau macrogéographique (Chapitre 2). Les résultats ont montré qu'il existait une différenciation géographique de la population de *Xam* au niveau des écozones (Chapitre 1). Nos résultats suggèrent également qu'au niveau du champ, le pathogène interagit avec le milieu et se diversifie.

Dans ce chapitre, nous analysons la diversité et la distribution microgéographique de l'agent pathogène au niveau du champ. Un échantillonnage intensif a été réalisé en prélevant un grand nombre de souches dans un ou deux champs de chaque écozone. Nous avons ensuite caractérisé les souches en utilisant: 1) la technique RFLP avec la sonde *pthB*, 2) la REP-PCR (chapitre 1.4.2), 3) la technique AFLP (décrite dans le chapitre 2.3). Nous comparons les informations acquises par ces trois types d'analyses. La REP-PCR peut permettre de disposer d'une technique de typage simple, reproductible et rapide pour des études de structure de

population qui nécessitent l'analyse d'un grand nombre de souches (82). L'avantage de l'AFLP est son pouvoir discriminant, déjà démontré pour un groupe de souches de *Xam* (Chapitre 2.3). Nous avons vu que plusieurs facteurs pouvaient agir sur la diversité de l'agent pathogène. Dans cette analyse, nous tenterons de préciser le rôle de certains facteurs sur la structure des populations de *Xam*.

4.2 Etude de la diversité génétique de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* à l'intérieur de différents champs en Colombie.

Measurement of the genetic diversity in *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* within different fields in Colombia. Vélez C., Restrepo S. and Verdier V. Soumis Phytopathology.

**Measuring the Genetic Diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* Within
Different Fields in Colombia**

S. Restrepo, C. M. Vélez, and V. Verdier

Biotechnology Research Unit, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) and
Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Cali, Colombia. ¹

¹ Corresponding author : V. Verdier; E-mail address: v.verdier@cgiar.org

ABSTRACT

Cassava bacterial blight, caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*), is a widespread disease that affects cassava (*Manihot esculenta* Crantz). To select and deploy resistant cassava genotypes, the pathogen's population structure must be characterized. We collected 246 *Xam* isolates by intensively sampling single fields in four edaphoclimatic zones (ECZs) in Colombia. DNA polymorphism of different *Xam* populations was assessed by RFLP analyses, rep-PCR, and AFLP assays. Genetic diversity, phylogenetic relationships among strains, and the coefficient of genetic differentiation were determined. All strains were tested for virulence on the susceptible cassava variety M COL 1522. Strains were also tested for the reactions they provoked in cassava differentials adapted to the strains' respective ECZs. Results indicated high genetic diversity among strains and even, within the same ECZ, among fields planted to several cassava genotypes. New haplotypes were detected, leading to the characterization of a new pathotype. Dendrograms from AFLP were more robust than those from RFLP data. The closest association between the strains' geographical origin and DNA polymorphism was obtained when RFLP and AFLP data were considered together. Our results suggested that the host played a role in causing pathogen differentiation.

Cassava bacterial blight (CBB) caused by *Xanthomonas axonopodis* sp. *manihotis* (*Xam*), is a major constraint to cassava cultivation worldwide (9). Cassava provides food and income for about 500 million people living in the tropics. Cassava is propagated by planting pieces of stem, permitting the pathogen to be disseminated through infected planting material. Root yield losses ranging from 12 to 100% were reported (9). Losses induced by CBB affect also the planting material. Incidence of the disease can be reduced by a combination of cultural practices, sanitation measures and the use of varietal resistance (9). The use of varietal resistance is the most realistic and appropriate way to control the disease (9).

Genetics of resistance to CBB have not been extensively studied in cassava, and genes governing resistance have not yet been documented. Information on the structure of *Xam* populations is thus a prerequisite for studying the disease and subsequently for guiding the future selection and deployment of CBB-resistance genes (7). As was recently observed in Africa, changes in the pathogen's population structure may lead to the overcoming of the deployed resistance (3). The dissemination of *Xam* through infected cuttings has important implications for controlling the disease. Understanding pathogen migration and how it influences population genetic structure, is therefore important.

Genetic diversity of *Xam* was mainly characterized by RFLP analyses (14,19,20). The use of a plasmid probe (*pthB*) makes RFLP analyses more discriminatory than genomic probes or ribotyping (19). A 1996 study of distribution of pathogen diversity among edaphoclimatic zones (ECZs) and sites in Colombia revealed the genetic variability of *Xam* in that country and population substructuring at the ECZ level (14).

Caution must be taken when inferring phylogeny based on data from one or a few molecular markers (13). To avoid potential bias in genetically characterizing a pathogen population, the population structure must be inferred from a variety of neutral markers (7). Recently, two techniques were shown to be very useful for studying plant pathogen population structures: rep-PCR and AFLP. rep-PCR is simple and fast (18), and has been used for characterizing *Xanthomonads* and *Pseudomonads* (8,18). AFLP is a novel DNA fingerprinting method that can be used on any DNA, regardless of origin or complexity (21). AFLP analyses offer the possibility of a broader genome coverage. Their usefulness in characterizing bacterial populations was shown by Janssen et al. (6), and their applicability to the study of *Xam* populations and their high discriminatory power were demonstrated by Restrepo et al. (15) when characterizing *Xam* populations with low levels of genetic diversity.

The objective of this study was to continue the hierarchical analysis of the *Xam* population structure in Colombia by examining the variation and microgeographical distribution of the pathogen in different fields located in four ECZs. Resulting information was expected to be useful for guiding deployment strategies and designing epidemiology studies (18). *AXam* collection was sampled in 1997 from six experimental and two farmers' fields. Isolates were analyzed by RFLP, rep-PCR, AFLP assays and, pathogenicity tests. The molecular techniques were compared for their efficiency in measuring and describing genetic diversity.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates and collection of infected samples. Collections were made from eight fields located in four ECZs: 1 = subhumid tropics, 2 = acid-soil savannas, 5 = high-altitude tropics and 2/5: an ECZ sharing characteristics with ECZs 2 and 5. Fields were sampled intensively at random and along diagonals. Samples of infected stems or leaves were collected from various cassava plants within each field. Collections were made from one improved cultivar at site F, from two traditional cultivars at site A, and from various improved cultivars at the other sites (B, C, D, E, G and P). An average of 35 samples from infected plants were collected per field. Of each sample, a single bacterial colony was isolated on YPGA medium (5 g/l yeast extract, 5 g/l glucose, 5 g/l bacto peptone, 15 g/l agar) We obtained 246 isolates and preserved them in 60% glycerol at -80°C .

Following the equation,

$$N = \log(1-P) / \log(1-F),$$

where N = number of samples ($N = 246$) required to detect a given haplotype present at a frequency (F) at least once with a probability of 95%,

the sampling strategy detected variants present at a frequency of 1.2% in the population (7).

RFLP and rep-PCR characterization. All the isolates were analyzed by RFLP analysis, using the plasmid probe *pthB*. All procedures were identical to that previously described (14), except that, before DNA extraction the strains were grown for 12 h on YPGA solid medium, then collected from the petri dish, and centrifuged twice at 10,000 rpm for 5 min in 1 M NaCl. Each strain was analyzed at least twice and the RFLP banding patterns were compared in a single blot to confirm that each pattern was unique.

A set of 19 isolates, representing the 19 *pthB* haplotypes detected, was further characterized by rep-PCR. The primers used for PCR amplification were:

ERIC (ERIC1R 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3');

ERIC2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3')

and REP (REP1R-I 5'-IIICGICGICATCIGGC-3');

REP2-I 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3').

PCR protocols were as described by Vera Cruz et al (18), except for the composition of the buffer (100mM Tris HCl, pH 8.3, 33.5 mM MgCl₂ and 500 mM KCl). PCR amplifications were performed in an automated thermal cycler; and the program was as described by Vera Cruz et al. (18). A 10- μ l portion of amplified PCR product was separated by electrophoresis on 1.5% agarose gels in 0.75 X TAE buffer (40 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, adjusted to pH 7.6 with glacial acetic acid) at 45 V for 15 h, stained with ethidium bromide, and scanned with a video system (EagleeyeII, Stratagene). Amplifications were done at least twice for each strain.

AFLP assays. AFLP markers were assayed as described by Vos et al. (21), with modifications as previously described by Restrepo et al (15). DNA was digested with one combination of enzymes (*EcoRI/MseI*), then ligated to the respective adapters. The selective amplifications were performed, using two combinations of primers *EcoRI+T/MseI+T* and *EcoRI+T/MseI+A* (15). After completing the second amplification, products were separated on a 6% polyacrylamide denaturing gel as previously described (15). Reproducibility of AFLP was assessed by twice loading the same PCR product in either the same gel or different gels.

Pathogenicity tests All isolates were evaluated for virulence on the susceptible cassava cultivar M COL 1522 as previously described (14). Disease severity was rated on a 0 to 5 scale, where 0 = healthy plant and 5 = complete wilting. According to the disease reaction, virulence of isolates was classified into three categories: 0 to 2.49 (not aggressive), 2.5 to 3.49 (weakly aggressive), and 3.5 to 5.0 (very aggressive).

Strains corresponding to the new RFLP*pthB* haplotypes detected in this study were inoculated by stem puncture on a set of 14 cassava differentials, previously selected (S. Restrepo, M. C., Duque, and V. Verdier *unpublished*). Plants were arranged in the greenhouse according to a randomized complete block design in four replicates. Uninoculated plants were included in each experiment as control. The experiment was conducted twice. Plants with a mean disease reaction of ≤ 3 were grouped as resistant, while those with a disease reaction of > 3 were classified as susceptible.

Data analysis. Each unique banding pattern generated by the *pthB* probe, AFLP primer combinations, or rep-PCR primers was regarded as a haplotype. The presence of a band was coded as 1, and its absence as 0. We used NTSYS-pc, version 1.80 (16), to calculate a similarity matrix, using Jaccard's coefficient of similarity. Cluster analysis was done with the unweighted pair grouping method of averages (UPGMA) in the SAHN program of NTSYS-pc. A dendrogram was constructed with the TREE option. Correlation between the RFLP and AFLP assays was determined by the NTSYS-pc option MXCOMP, which compared similarity matrices generated for each technique, using Jaccard's coefficient of similarity with the same set of strains.

The robustness of each phenogram was evaluated by a bootstrap analysis of each data set (2), using the computer program WinBoot (23). Each phenogram was reconstructed 1,000 times by repeated sampling with replacement. The frequency with which a particular grouping was identified was taken to reflect the strength of the grouping.

The diversity of strains from each field, ECZ and the entire country was estimated by Nei and Tajima's diversity index (H_T) (12). A genetic differentiation coefficient (G_{ST}) was calculated as $G_{ST} = (H_T - H_s)/H_T$ where H_T is the total genetic diversity of *Xam* in Colombia and H_s is the average genetic diversity in each ECZ or field.

RESULTS

RFLP analysis. A total of 23 bands, ranging in size from 2.4 to 26kb, was scored. With the *pthB* probe, we found 19 distinct haplotypes among the 246 Colombian isolates collected in 1997 (Table 1 and Fig. 1). Nine of the haplotypes (C4, C6, C8, C9, C12, C13, C15, C17, and C18) found in 167 isolates had been recovered in 1995-1996 (14), and the remaining 10 (C27, C28, C29, C30, C31, C33, C34, C35, C36, and C37) were new (Table 1). Two haplotypes (C34 and C37) were represented by a single isolate, whereas others were represented by as many as 41 isolates (e.g. C4). The haplotypes most frequent in ECZs 1, 2, 2/5, and 5 were C18 (67% of the analyzed isolates), C4 (54%), C35 (71%) and C8 (65%), respectively. Seven of the eight haplotypes described for ECZ 2 were detected at site E (Table 1). All the haplotypes present in ECZs 1 and 5 could be detected in sites G and B, respectively (Table 1).

In Colombia, the total genetic diversity of the *Xam* collection was 0.9 (Table 2). ECZ 2 had the highest level of haplotypic diversity (0.68), with eight haplotypes among 81 isolates analyzed (Tables 1 and 2). At sites A and F, no differentiation of the pathogen population was

seen. Pathogen diversity was high within the fields planted with several improved cultivars (Table 2). In contrast, the diversity index was 0 for sites A and F where only two and one cultivar respectively, were cultivated (Table 2). The G_{ST} estimate was large at both field and ECZ levels (0.5 and 0.4, respectively). For each ECZ considered separately the G_{ST} index at a field level was 0.67, 0.63 and 0.3 for ECZs 1, 5, and 2, respectively (data not shown).

rep-PCR analyses. The ERIC primers yielded two fingerprint types (Fig. 2A). Amplification with the REP primers yielded three fingerprint types (Fig. 2B). The size of the amplification products ranged from 800 to 3,200 bp. Patterns obtained were highly similar among the 19 isolates representing the 19 *pthB* haplotypes described above with differences limited to the presence or absence of one to four bands. The fingerprinting patterns of the isolates were highly reproducible with each of the two primer sets.

AFLP assays. Reproducibility was estimated by running amplifications of the strain CIO 378 on the same and different gels. Banding patterns, when loaded in the same gel, were identical, and, when loaded in different gels, showed differences of less than 1%. For the two primer combinations selected, 130 bands were evaluated, 75 for primer combination *EcoRI*+T/*MseI*+T and 55 for primer combination *EcoRI*+T/*MseI*+A. The total number of bands obtained with the two AFLP combinations is four times more than that obtained with the RFLP/*pthB* technique. Strains belonging to *pthB*-haplotype C8 were differentiated into 20 different AFLP haplotypes. The percentage of polymorphic bands was 90% for both combinations, showing the high level of polymorphism detected by this technique. With only one exception, all the strains collected in the same field shared the same AFLP haplotype. Strains CIO 689 and CIO 707 showed the same AFLP and RFLP haplotypes, but were collected in fields F and G, respectively, both located in ECZ 1. Fig. 3 shows polymorphisms detected among AFLP fingerprints, using the primer combination *EcoRI*+T/*MseI*+T for strains collected in fields B, G, and P.

Cluster analysis To study the genetic relationships among strains, the RFLP/*pthB* and AFLP haplotypes were analyzed separately and combined by cluster analysis. The correlation coefficient between the AFLP and RFLP similarity matrix was low ($r = 0.48$). Fig. 4 depicts the clustering of *Xam* strains into 17 groups at 70% similarity when considering the RFLP data. Strains were clustered into 18 and 23 groups at 70% of similarity, using AFLP data and RFLP/AFLP data combined, respectively (Figs. 5A and 5B). Genetic similarities occurred

between 0 and 1 for dendrograms derived from the RFLP data and between 0.5 and 1 for the AFLP dendrograms.

Clusters obtained through the RFLP technique correspond to the *pthB* haplotypes, except for the three haplotypes (C35, C31, and C30) detected in field P and found in cluster 11 (Table 1 and Fig. 4). This may suggest that the strains collected in field P are highly similar and that some haplotypes probably derived evolutionally from other strains present in the same field or that they share a common ancestor. Bootstrap values shown in the RFLP dendrogram (Fig. 4) are very low, particularly for branches formed between similarity levels between 0 and 0.5. Bootstrap values are higher for the AFLP and AFLP/RFLP dendrograms (Fig. 5) showing that clusters obtained by AFLP are more robust and more reliable for phylogenetic studies.

Using the AFLP technique, most strains collected from field F clustered with the strains collected from field G (Table 1 and Fig 5A). The correlation between the geographical origin of the strains at field level and DNA polymorphism is higher for AFLP than for RFLP data. For example, using RFLP, strains collected from fields C, D, and E located in ECZ 2 were frequently grouped together (clusters 4, 5, and 7). According to AFLP data, these strains were grouped in three distinct clusters (Table 1 and Fig. 5A). However, the finest correlation between geographical origin and DNA polymorphism was obtained by combining the RFLP and AFLP data to construct the dendrogram shown in Fig. 5B.

Pathogenicity tests. About 92 % of *Xam* isolates were very aggressive (disease index >3.5) when evaluated on the susceptible cassava cultivar M COL 1522. No significant differences were observed in aggressiveness among isolates collected at different sites (Table 1). All the isolates collected from site D were very aggressive. At site P, 15% of the isolates were either weakly aggressive or not aggressive. No correlation was found between the aggressiveness of the isolates and AFLP or RFLP haplotypes.

When the strains representing the 10 new RFLP haplotypes were inoculated onto cassava cultivars adapted to the respective strain's ECZ, five pathotypes were characterized, three previously detected (pathotypes 1-2, 2-3, and 5-1) and one new (pathotype 2-9) (Table 3). Another new pathotype (2-5-1) was defined for strains collected at site P (ECZ 2/5) and inoculated on two cultivars adapted to ECZs 2 and 2/5. Because the cassava differential used had been selected to characterize strains collected in ECZs 1, 2 and 5, another set of differentials has to be selected for characterizing ECZ2/5 strains.

DISCUSSION

Our study showed that the Colombian *Xam* population has a high degree of genetic diversity. To assess the role of host diversity in structuring pathogen population, we related pathogen diversity to the number of improved cultivars planted. Pathogen populations isolated from fields cultivated with one or two varieties (whether traditional or improved) were less diverse than populations derived from fields (e.g. sites E, G, and B) where a large number of improved cultivars were planted. The G_{ST} estimate was larger in ECZs 1 and 5 where subpopulations at sites F and A are highly homogeneous with only one haplotype detected. Diversity at loci involved in host/pathogen interactions seems to be affected by differences in host population structure and this diversity is detected by RFLP/*pthB*.

The best strategy for sampling a pathogen population depends on the way that variation is distributed in space (7). A previous study demonstrated that a higher diversity was found in cassava fields located in ECZ 1 and 2 (14). In the present study, fewer fields were sampled but they were sampled more intensively and the probability of finding rare haplotypes is higher. Ten new haplotypes were detected that had not been previously described (14). The new haplotypes occurred at low frequencies in their respective populations reflecting the importance of the sampling strategy used to detect variants within populations. However, 16 haplotypes previously detected (14) were not found in this study; from which 14 were detected in only one strain in 1995-1996. Such findings may have been a result of either a low frequency in the population or disappearance through selection pressure. A new pathotype was also detected among the strains representing the new haplotypes.

Our results suggest that the genetic variation detected with RFLP/*pthB* is evolving more rapidly than the virulence phenotypes. The sampling strategy and sample size also show that, in experimental fields, the genetic variation in *Xam* is distributed in a fine-scaled pattern on a microgeographical scale ($H_S = 0.68$ in Villavicencio). This distribution of variability was previously shown with other pathogens (10,11,22). The hierarchical genetic diversity analysis also indicated that the RFLP variation was generally distributed within locations. The G_{ST} estimate was large, indicating that within a subpopulation (field or ECZ), diversity is low relative to that of the entire population. This suggests a genetic differentiation of the pathogen at field and ECZ levels.

A realistic sample size and strategy should be chosen to yield adequate information without expending excessive effort for a small increment in detection power (7). All the fields planted to many cultivars were representative of the diversity found in the respective ECZ, suggesting that sampling can be done in only one field per ECZ.

From experimental epidemiology, we know that migration can be a significant factor in the biology of many pathogens (1). In the Philippines, the deployment of a rice genotype that carried the resistance gene *Xa-4* led to a race shift in the pathogen. This shift resulted from mutation and migration from a distant population (4). In our study, we could detect pathogen migration through the RFLP/*pthB* analyses. The RFLP haplotypes are specific to each ECZ but, within an ECZ, the same haplotype can be found in different fields. In ECZ 2, haplotype C4 was found at the three sites visited and was always collected from the same variety (M CUB 74), suggesting that the strain migrated through exchanges of contaminated planting material.

The resolving power to detect diversity of a population depends on the technique used. The designing of diversity monitoring studies, requires simple techniques to process large numbers of samples. In our study, rep-PCR technique was less discriminatory than RFLP, showing less than 1% polymorphism among the analyzed strains and suggesting that, at the genomic level, *Xam* is a homogeneous bacterium. The plasmid probe *pthB* is more discriminatory than other techniques that study DNA at the genomic level. Neither the genomic probes pBS6 nor pBS8 (14), nor the rep-PCR technique (this study) permitted the differentiation of most isolates. In contrast, with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, both RFLP and rep-PCR consistently grouped the same subsets of strains together into genetic groups (18). The low correlation between RFLP/*pthB* and AFLP data is a consequence of the techniques revealing different aspects of *Xam* variability, that is, they analyze different regions and proportions of the genome. AFLP markers are also more widely dispersed throughout the genome and the number of bands produced by each primer combination is larger than that from RFLP data. Spooner et al. (17) suggested that when the number of bands analyzed is increased, so also is the reliability of the phenetic relationships determined. Analysis of a larger number of bands allows a more robust statistical analysis, with a higher probability that the dendrogram produced is representative of the organism's population structure (5). In our case, robustness of the phenogram obtained with AFLP data was much higher than that of the one obtained with RFLP data. Also, a close association between geographical origin (field) and the phenetic classification was observed when AFLP and RFLP data were considered together. The bootstrap analysis of the AFLP data

and AFLP and RFLP combined, particularly at the cluster level, and the range of similarities obtained with AFLP and RFLP data also suggest that phenetic inferences based on the RFLP/*pthB* technique must be made cautiously. We recommend that AFLP data or AFLP and RFLP data combined be used to make phenetic inferences on *Xam* populations.

Most strains collected in the same field clustered together when using AFLP technique, showing that ECZ populations of *Xam* represent different phyletic groups. However, at field B (ECZ 5) different phyletic groups exist suggesting that different founder effects are occurring, probably because new cultivars have been recently introduced. The inconsistencies within some clusters (e.g., strains from fields B and G, ECZs1 and 5, respectively, had clustered together) may reflect exchanges that have occurred between phyletic groups.

We have developed robust and efficient genetic markers, useful for studying *Xam* populations. Depending on the purposes of the study, the RFLP or AFLP techniques, or the combination of both, may be suitable for use. The RFLP/*pthB* technique is useful for estimating genetic diversity, because the distribution of the haplotypes reflects the adaptation of both host and pathogen to the different ecosystems. To learn more about population dynamics within *Xam*, the next step is to study how the genetic structure relates to the prevalence and distribution of virulence characteristics. Additionally, knowledge of the population structure in experiment fields over time will enable us to determine whether resistance breakdown is associated with corresponding changes in the genetic structure of the pathogen's population

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank W. M. Roca and J. Tohme for their support and J. I. Lenis, W. Gaitan, and V. Jorge for their help during sampling. We are also grateful to E. de Páez (CIAT) for editing. This work was supported by a doctoral fellowship awarded to S. Restrepo by the Institut de recherche pour le développement, (France) and by a fellowship from the Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco José de Caldas” (COLCIENCIAS) awarded to C. M. Vélez.

LITERATURE CITED

1. Barret, J. A. 1987. The dynamics of genes in populations. Pages 39-53 in: Populations of Plant Pathogens: Their Dynamics and Genetics. M. S. Wolfe and C. E. Caten, eds. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
2. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 9:366-369.
3. Fessahaie, A. 1997. Biochemical/physiological characterization and detection methods of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (Berthet-Bondar) Dye 1978, the causal organism of cassava bacterial blight. Ph. D. thesis, University of Göttingen, Germany.
4. George, M. L. C., Bustaman, M., Cruz, W. T., Leach, J. E., and Nelson, R. J. 1997. Movement of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in southeast Asia detected using PCR- based DNA fingerprinting. *Phytopathology* 87:302-309.
5. González, M., Rodriguez, R., Zavala, M. E., Jacobo, J. L., Hernandez, F., Acosta, J., Martinez, O., and Simpson, J. 1998. Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. *Phytopathology* 88:292-299.
6. Janssen, P., Coopman, R., Huys, B., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M., and Kersters, K. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool to bacterial taxonomy. *Microbiology* 142: 1881-1893.
7. Leung, H., Nelson, R. J., and Leach, J. E. 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *Adv. Plant Pathol.* 10:157-205.
8. Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., and de Bruijn, F. J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85: 528-536.
9. Lozano, J. C. 1986. Cassava bacterial blight: a manageable disease. *Plant Dis.* 70:1089-1093.
10. McDonald, B. A., McDermott, J. M., Allard, R. W., and Webster, R. K. 1989. Coevolution of host and pathogen populations in the *Hordeum vulgare*-*Rhynchosporium secalis* pathosystem. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 86:3924-3927.
11. McDonald, B. A. and Martinez, J. P. 1990. DNA restriction fragment length polymorphisms among *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) isolated from a single wheat field. *Phytopathology* 80:1368-1373.
12. Nei, M., Tajima, F. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97:145-163.

13. Nelson, R. J., Baraoidan, M. R., Vera Cruz, C. M., Yap, I. V., Leach, J. E., Mew, T.W., and Leung, H. 1994. Relationship between phylogeny and pathotype for the bacterial blight pathogen of rice. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3275-3283.
14. Restrepo, S., and Verdier, V. 1997. Geographical differentiation of the population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4427-4434.
15. Restrepo, S., Duque, M. C., Tohme, J., and Verdier, V. 1999. AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Microbiology* 145:107-114.
16. Rohlf, F. J. 1994. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and multivariate Analysis System Version 1.80. Exeter Software, New York
17. Spooner, D. M., Tivang, J., Nienhuis, J., Miller, J T., Douches, D. S., and Contreras, M. A. 1996. Comparison of four molecular markers in measuring relationships among the wild potato relatives *Solanum* section *Etuberosum* (subgenus *Potatoe*). *Theor. Appl. Genet.* 92(5):532-540.
18. Vera Cruz, C. M., Ardales, E. Y., Skinner, D. Z., Talag, J., Nelson, R. J., Louws, F. J., Leung, H., Mew, T. W., and Leach, J. E. 1996. Measurement of haplotypic variation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by rep-PCR and RFLP analyses. *Phytopathology* 86: 1352-1359.
19. Verdier, V., Dongo, P., and Boher, B. 1993. Assessment of genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *J. Gen. Microbiol.* 139:2591-2601.
20. Verdier, V., Boher, B., Maraite, H., Geiger, J. P, 1994. Pathological and molecular characterization of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of cassava (*Manihot esculenta*). *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4478-4486.
21. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kluper, M., and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.
22. Xia, J. Q., Correll, J. C., Lee, F. N., Marchetti, M. A., and Rhoads, D. D. 1993. DNA fingerprinting to examine microgeographic variation in the *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*) population in two rice fields in Arkansas. *Phytopathology* 83:1029-1035.

23. Yap I., and Nelson, R. J. 1996. Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrogrammes. IRRI Discussion Paper Series No. 14. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

TABLE 1. *Xanthomonas axonopodis*pv. *manihoti* strains used to study the genetic diversity of this bacterium in Colombia. The origin, edaphoclimatic zone (ECZ), *pthB* haplotype and aggressiveness class of the strains are indicated. The AFLP and RFLP clusters (numbered 1 to 23) are also indicated per group of strains.

Site ^a	ECZ ^b	Strain	<i>pthB</i> haplotype	Ag. Class ^c	Cluster		
					RFLP	AFLP	RFLP/AFLP
A	5	CIO 378 to 402	C8	M, H	1	1	1
B	5	CIO 726 to 761	C8, C9, C36, C37	M, H	1, 2, 8, 9	4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 14	4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 23
C	2	CIO 611 to 637	C4, C12, C17	M, H	4, 5, 7	2	2
D	2	CIO 509 to 531	C4, C12, C13, C17, C27	H	3, 4, 5, 6, 7	12	13
E	2	CIO 503 and 638 to 667	C4, C12, C17, C27, C28, C29, C34	M, H	3, 4, 5, 7, 13, 16, 17	15	15, 17
P	2/5	CIO 536 to 590	C30, C31, C35	L, M, H	11	13, 14	14
F	1	CIO 676 to 690	C18	L, H	10	3, 15, 16	18, 20
G	1	CIO 691 to 724	C6, C15, C18, C33	M, H	10, 12, 14, 15	3, 6, 7, 8, 11, 15, 16, 17, 18	3, 4, 5, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23

^a Fields at A = Cajibío; B = Mondomo; C = Matazul; D = Carimagua; E = Villavicencio; F = Caracolí; G = Pivijay; P = Santander de Quilichao.

^b 1 = subhumid tropics; 2 = acid- soil savannas; 5 = high-altitude tropics; 2/5 = ECZ with characteristics of ECZs 2 and 5.

^c H = very aggressive; M = weakly aggressive; L = not aggressive.

TABLE 2. Haplotypic diversity (H_s) of *Xam* population within each field, each edaphoclimatic zone (ECZ) and for the entire Colombian *Xam* collection (H_T). The coefficient of genetic differentiation (G_{ST}) was calculated for both field and ECZ levels.

Field	Site	ECZ ^a	Cassava cultivars		Genetic diversity index ^b	
			Type	Number	H_s (field)	H_s (ECZ)
A	Cajibío	5	Traditional	2	0	
B	Mondomo	5	Improved	33	0.66	0.53
C	Matazul	2	Improved	30	0.62	
D	Carimagua	2	Improved	30	0.64	0.68
E	Villavicencio	2	Improved	30	0.68	
P	Santander	2/5	Improved	16	0.46	0.46
	Quilichao					
F	Caracolí	1	Improved	1	0	
G	Pivijay	1	Improved	30	0.61	0.52

$$H_T (\text{Colombia}) = 0.9$$

$$G_{ST} (\text{ECZ}) = 0.4$$

$$G_{ST} (\text{field}) = 0.5$$

^a 5 = high-altitude tropics; 2 = acid-soil savannas; 2/5 = ECZ with characteristics of ECZs 2 and 5; 1 = subhumid tropics.

^b Diversity index calculated as described by Nei and Tajima (12)

TABLE 3. Pathotypes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* defined after analysis of reactions between strains and cassava cultivars adapted to the same edaphoclimatic zone (ECZ), Colombia

ECZ ^a	Pathotype	Strain	Cultivar					
			M BRA 685	M COL 22	M VEN 25	M COL 1505	M BRA 12	M NGA 2
1	1-2 ^c	CIO 704	R ^c	S ^c	S	S	S	R
2	2-3 ^c	CIO 503, 640, 645	CM 5286-3	CM 2177-2	M BRA 902	CM 6438-14	CM 523-7	
			S	S	S	S	S	
2-5	2-5-1	CIO 571, 574, 556	CIO 527	R	R	R	R	
			S	R	R	R	R	
5	5-1 ^c	CIO 730, 755	CG 402-11	M COL 1522	M COL 2261			
			S	S	S			
2-5	2-5-1	CIO 571, 574, 556	CM 2177-2	CM 523-7				
			S	S				

^a 1 = subhumid tropics; 2 = acid-soil savannas; 5 = high-altitude tropics; 2/5 = ECZ with characteristics of ECZs 2 and 5.

^b R = resistant reaction with a mean disease rating of less than or equal to 3; S = susceptible reaction with a mean disease rating greater than 3.

^c Pathotypes as previously described by S. Restrepo, M. C., Duque, and V. Verdier (*unpublished*).

Fig. 1. Southern blot analysis of *EcoRI*-digested genomic DNA from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* isolates hybridized with the *pthB* probe. The 19 haplotypes detected are presented in lanes: 1 = strain CIO 521 (haplotype C4); 2 = CIO 716 (C6); 3 = CIO 726 (C8); 4 = CIO 745 (C9); 5 = CIO 657 (C12); 6 = CIO 520 (C13); 7 = CIO 713 (C15); 8 = CIO 614 (C17); 9 = CIO 691 (C18); 10 = CIO 527 (C27); 11 = CIO 645 (C28); 12 = CIO 640 (C29); 13 = CIO 571 (C30); 14 = CIO 574 (C31); 15 = CIO 704 (C33); 16 = CIO 503 (C34); 17 = CIO 556 (C35); 18 = CIO 755 (C36); 19 = CIO 730 (C37). M = 1kb ladder, molecular weight marker.

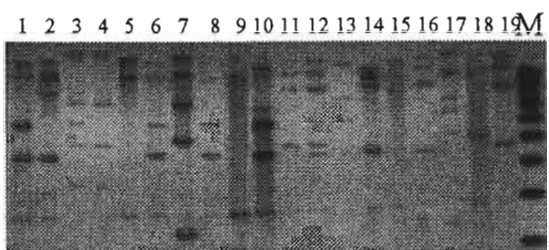
Fig. 2. Agarose gel showing patterns of each *pthB*-haplotype strain of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. The patterns were generated by rep-PCR with **A**, ERIC and **B**, REP primers. Lanes: 1 = strain CIO 521 (haplotype C4); 2 = CIO 716 (C6); 3 = CIO 726 (C8); 4 = CIO 728 (C9); 5 = CIO 657 (C12); 6 = CIO 520 (C13); 7 = CIO 713 (C15); 8 = CIO 522 (C17); 9 = CIO 691 (C18); 10 = CIO 656 (C27); 11 = CIO 645 (C28); 12 = CIO 643 (C29); 13 = CIO 553 (C30); 14 = CIO 541 (C31); 15 = CIO 704 (C33); 16 = CIO 503 (C34); 17 = CIO 536 (C35); 18 = CIO 736 (C36); 19 = CIO 730 (C37). M = 1kb ladder, molecular weight marker.

Fig. 3. Banding pattern after amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* strains collected at different sites. The primer combination *EcoRI*+T/*MseI*+T was used. B = Mondomo; G = Pivijay; P = Santander de Quilichao.

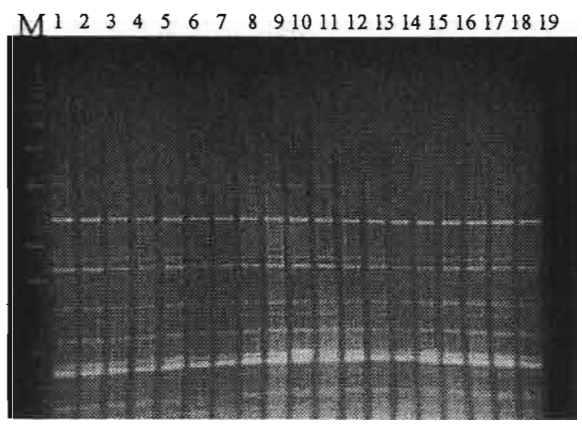
Fig. 4. Similarities among RFLP/*pthB* haplotypes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. The dendrogram of relationships among haplotypes was derived by cluster analysis of similarities between haplotypes, using the unweighted pair grouping method of averages (UPGMA). Sites of collection are indicated (A = Cajibío; B = Mondomo; C = Matazul; D = Carimagua; E = Villavicencio, F = Caracolí, G = Pivijay, P = Santander de Quilichao; all sites are in Colombia). The number at the branches show the percentage of times the cluster consisting of the strains (indicated at the right of that branch) occurred.

Fig. 5. Simplified dendrograms obtained by cluster analysis, using the unweighted pair grouping method of averages (UPGMA) among AFLP haplotypes (**A**) and RFLP and AFLP haplotypes (**B**). The number at the branches show the percentage of times the cluster (indicated at the right of that branch)

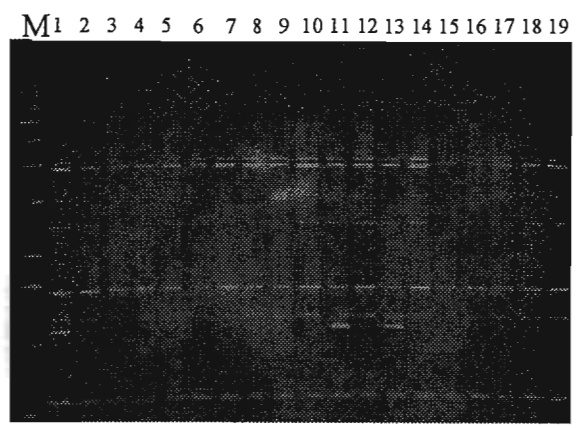
occurred. Shaded areas represent different sampling sites. Clusters were delineated at an arbitrary level of similarity = 0.70.



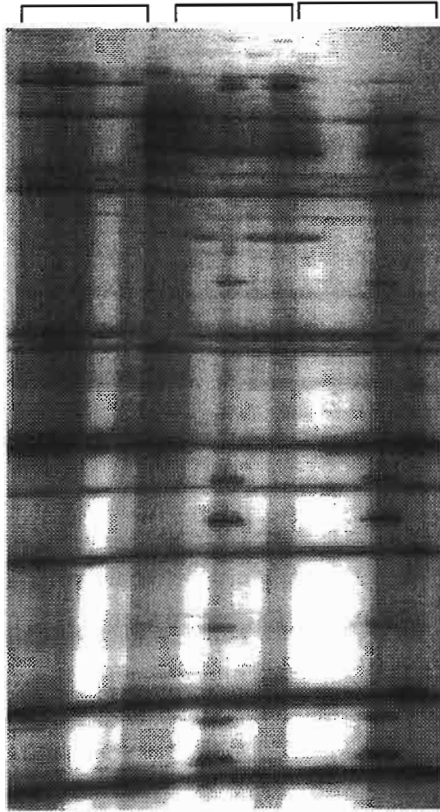
A

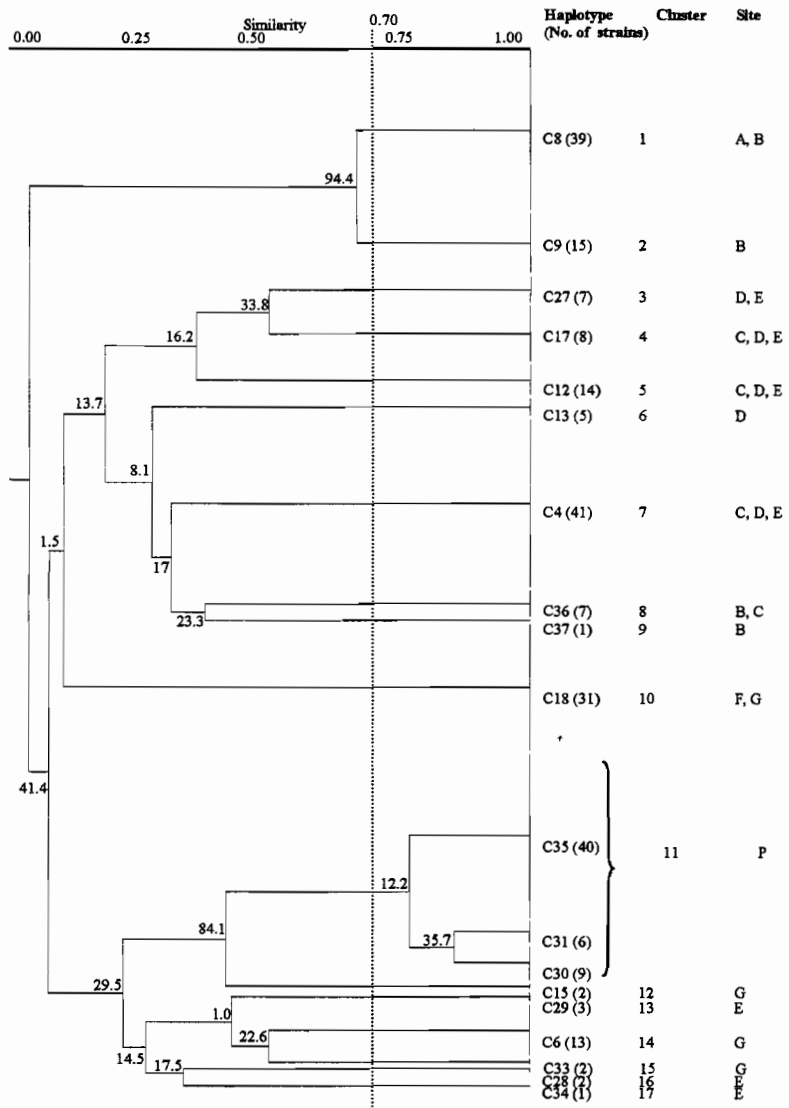


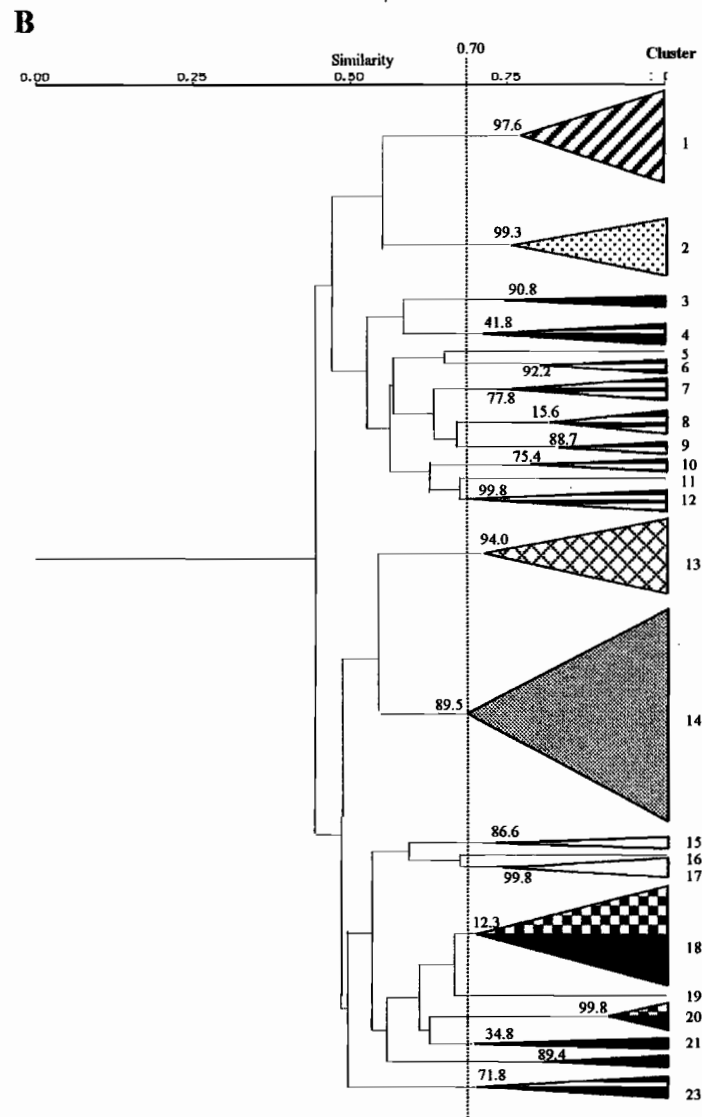
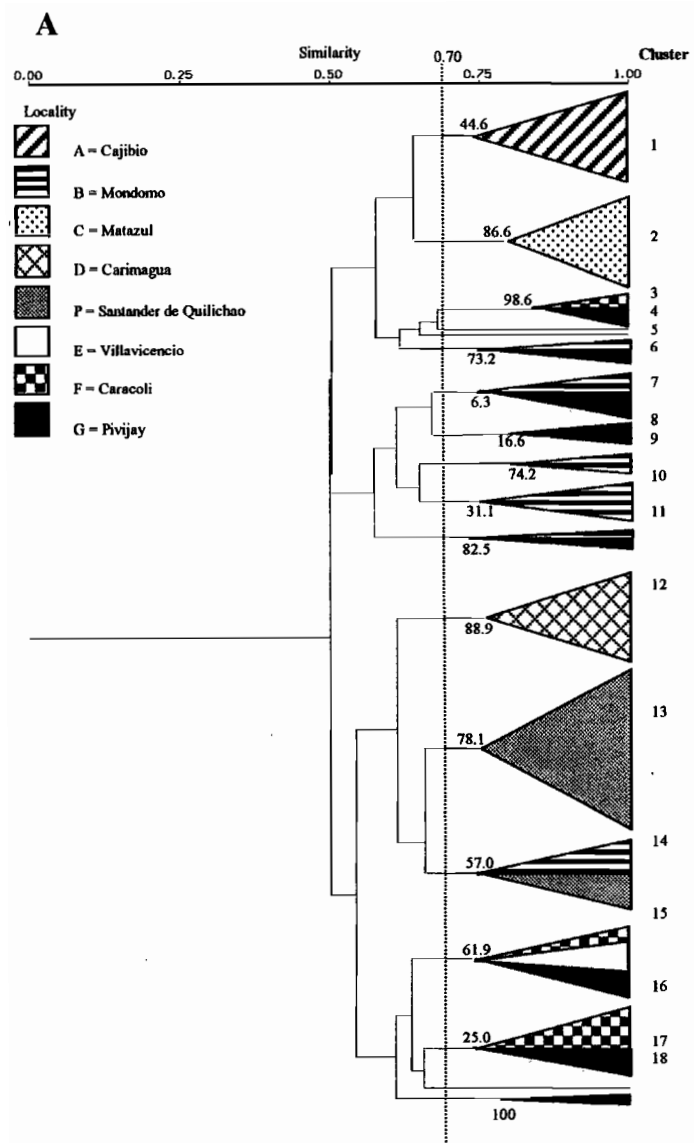
B



P B G B







4.3 Conclusion.

Il existe une corrélation élevée entre le nombre de cultivars de manioc cultivés et l'indice de diversité des populations de *Xam*. Ceci met en évidence le rôle de l'hôte sur la structure des populations de *Xam*. Cette corrélation est mise en évidence en analysant les résultats obtenus avec la technique RFLP / sonde *pthB*.

Dans cette étude, nous avons comparé plusieurs méthodes moléculaires pour l'étude de la structure des populations de *Xam*. Les techniques basées sur la PCR permettent de mettre au point des outils simples, faciles à utiliser et peu coûteux. Cependant, pour l'étude de la diversité de *Xam*, les résultats obtenus par la technique rep - PCR sont peu discriminants et ne montrent pas de corrélation avec les groupes RFLP / *pthB* ou AFLP déjà caractérisés pour ces souches. Gagnevin (81) montre également, pour les souches du pathovar *mangiferaindicae*, que les résultats obtenus avec la technique rep - PCR ne présentent pas de corrélation avec ceux obtenus par la méthode RFLP.

Précédemment (chapitre 2.3), nous avons montré que les techniques RFLP et AFLP permettaient de différencier des populations de *Xam* génétiquement très homogènes. Dans cette étude, nous avons donc choisi d'utiliser ces deux techniques pour déterminer les relations phénétiques d'un grand nombre de souches (246 souches), collectées dans des champs situés dans quatre ECZs différentes. En analysant les résultats AFLP, des groupes robustes ont été obtenus et sont corrélés à l'origine géographique des souches. En utilisant une analyse UPGMA avec les résultats combinés AFLP et RFLP / *pthB*, cette corrélation est d'autant plus claire et précise (au niveau des champs). Nous recommandons l'analyse des dendrogrammes établis en utilisant la technique AFLP seule ou combinée à l'analyse RFLP / *pthB* pour l'établissement des relations phénétiques entre les souches.

La corrélation obtenue entre les profils obtenus par AFLP / RFLP et l'origine géographique des souches peut indiquer que ces souches aient évolué à partir d'un ancêtre commun. Cette évolution impliquerait des modifications du nombre de copies du gène *pthB*, de sa structure, et également des changements dans la structure génomique des souches. Le gène *pthB* est porté par un plasmide et bien que nous n'ayons aucune évidence sur le transfert du plasmide d'une souche à l'autre, on peut penser que ce gène (ou d'autres gènes d'avirulence ou pathogénicité portés par des plasmides) soit échangé entre les souches de *Xam*. Des événements de

les différentes copies du gène ou des recombinaisons internes du gène pourraient intervenir dans *Xam* provoquant ainsi des changements dans la structure génétique des population de *Xam*. Il serait intéressant d'étudier l'effet des modifications du gène *pthB* (nombre de copies, recombinaisons internes) sur le phénotype de virulence des souches. De nouvelles spécificités pourraient également apparaître au sein de *Xam*, résultat de la pression exercée par l'hôte (nombre de cultivars dans le champ, présence de différents gènes de résistance) (130).

Cette étude nous permet également de conclure sur la stratégie d'échantillonnage réalisée et d'orienter celles à venir. Un prélèvement intensif des souches est nécessaire dans les champs présentant une distribution de la diversité au niveau microgéographique, c'est à dire dans les champs expérimentaux où un grand nombre de cultivars est cultivé. La diversité des populations de *Xam* caractérisée dans un champ expérimental d'une ECZ donnée reflète la diversité rencontrée au niveau plus général de l'ECZ. Nous recommandons donc d'échantillonner un seul champ par ECZ (champ expérimental).

On pourrait supposer que des groupes phénotypiques, les pathotypes par exemple, sont monophylétiques. Ils représentent des groupes évolutivement cohérents ou lignées. En nous basant sur le phénogramme obtenu en combinant les données RFLP /*pthB* et AFLP, deux pathotypes (pathotype 5-1 et pathotype 2-3) sont polyphylétiques, c'est à dire que chaque pathotype représente des groupes ("clusters") différents. Un plus grand nombre de cultivars pourrait être testé afin de déterminer si les souches appartenant au même groupe phénétique et ayant un pathotype identique présentent des comportements de virulence différents.

5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le principal objectif de notre travail était de caractériser la structure des populations de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* en Colombie. Etant donné la difficulté de prendre en compte la variation totale existant dans les populations de *Xam* naturellement associées au manioc, nous avons, dans une première approche, étudié une collection de souches provenant de trois écozones. La technique RFLP en utilisant la sonde plasmidique *pthB* s'est avérée très discriminante, beaucoup plus que d'autres techniques d'analyse de l'ADN génomique (ribotypage, RFLP en utilisant les sondes pBS6 et pBS8). Cette technique est très sensible pour la détection de variants génétiques dans les populations du pathogène et est une méthode de choix pour les études épidémiologiques de *Xam*.

Le principal résultat exposé dans le chapitre 2 est la caractérisation de sous-populations de *Xam*, spécifiques de chaque écozone. Cette étude nous a permis ensuite, de caractériser les différents pathotypes de *Xam* et d'évaluer la résistance des cultivars de manioc. Par ailleurs, en étudiant la structure des populations au niveau microgéographique, nous avons pu mettre en évidence l'effet de l'hôte sur la structure des populations. Les résultats ne nous ont pas permis d'analyser la corrélation entre la variabilité du pouvoir pathogène et la diversité génétique des souches de *Xam*. Il faudrait pour cela, déterminer le pouvoir pathogène d'un plus grand nombre de souches de *Xam* appartenant à un même haplotype. La corrélation entre les groupes UPGMA obtenus avec l'analyse AFLP et les pathotypes pourrait aider à déterminer l'évolution des pathotypes au cours du temps.

L'ensemble de ces travaux permet donc d'une part, de mieux comprendre la structure et l'évolution des populations de *Xam* de cette bactérie et, pour des études futures, de conseiller une stratégie d'échantillonnage par écozone. Les connaissances acquises sur la structure des populations de l'agent pathogène en Colombie et les techniques développées dans ce mémoire, ont d'ores et déjà permis d'étendre notre étude à d'autres populations de *Xam* au Venezuela et au Brésil (130, 191, 232). Dans l'avenir l'étude des populations de *Xam* devrait s'étendre à d'autres pays (Cuba, Paraguay, nord de l'Argentine, Togo) pour lesquels la bactériose vasculaire du manioc est un facteur limitant de la production et, où aucune information sur la variabilité de l'agent pathogène n'est disponible.

Selon l'information disponible actuellement et, en comparant tous les haplotypes caractérisés en Colombie, au Venezuela et au Brésil, les haplotypes de *Xam* sont spécifiques de chaque pays. Les populations de *Xam* collectées dans une même ECZs et dans deux pays différents ne possèdent pas d'haplotypes communs. Par contre, en comparant les haplotypes sud américains et africains, on constate que deux sont communs à ceux caractérisés en Afrique (au Nigéria et au Bénin) (8). Ce résultat conforte l'hypothèse selon laquelle les souches présentes en Afrique sont originaires d'Amérique du Sud (147, 218, 231). L'introduction de l'agent pathogène a pu se faire soit de Colombie soit du Brésil.

Par ailleurs, l'existence dans un pays ou dans une région spécifique (l'ECZ5 de Colombie par exemple) de population de *Xam* de structure clonale, est liée à l'influence de deux facteurs: d'une part les barrières géographiques (zone andine par exemple) qui ne favorisent pas l'échange de matériel végétal et réduit ainsi les probabilités de dissémination des souches de l'agent pathogène et, d'autre part, l'homogénéité des cultivars de manioc cultivés dans ces régions.

Une perspective issue de nos travaux est d'établir une base de donnée regroupant tous les haplotypes (de Colombie, du Brésil, de Venezuela et d'Afrique) et leurs caractéristiques (nombre et taille des bandes), leur distribution géographique et les pathotypes correspondant. Cette base de données facilitera d'une part la caractérisation et comparaison des souches provenant de différents pays et d'autre part, permettra d'orienter rapidement le choix des souches à utiliser pour la sélection de cultivars résistants.

Comme nous l'avons vu dans cette étude, les différents outils moléculaires utilisés n'explorent pas les mêmes aspects de la variabilité des micro-organismes. Aussi, le choix des marqueurs utilisés est important et dépend des questions auxquelles on veut répondre. Des marqueurs neutres, comme l'AFLP devraient permettre d'aborder les aspects de l'épidémiologie en dehors de toute notion de pouvoir pathogène, pour les mettre en rapport avec les pressions de sélection liées aux effets de l'environnement, à la compétition et aux interactions entre micro-organismes ainsi que l'aspect recombinaison à l'intérieur d'une population ou entre des populations. A l'inverse, des marqueurs liés au pouvoir pathogène devraient permettre d'évaluer l'influence des variations temporelles de tels gènes (comme les gènes *avr* du type *avrBs3*, dont une forte aptitude à la recombinaison intra et intergénique serait à l'origine de variations rapides dans le pouvoir pathogène) sur les populations, leur rôle dans les équilibres dynamiques entre populations et en relation avec le spectre d'hôte et l'agressivité.

Nous avons utilisé plusieurs techniques moléculaires pour l'analyse de la variabilité des souches de *Xam*. La plupart des techniques et en particulier celles qui détectent la variabilité au niveau chromosomique, ne sont pas adaptées aux objectifs de notre étude car leur pouvoir discriminant est faible. Par contre, la technique AFLP est un outil performant car très sensible, discriminant et reproductible. Les dendrogrammes établis à partir des résultats obtenus par AFLP sont très robustes. La technique AFLP permet d'étudier les relations phénétiques entre les souches, et par conséquent de comprendre l'évolution des pathotypes et le potentiel de changement de *Xam*. La technique AFLP a l'avantage de permettre l'analyse simultanée de 50 à 60 profils génomiques sur un même gel, ce qui facilite l'acquisition des données. Toutefois, cette technique ne présente pas que des avantages. Tout d'abord, elle nécessite un ADN de bonne qualité sous peine d'obtenir de mauvaises digestions ou digestions partielles qui biaisent les résultats avec l'obtention de bandes non-reproductibles (183). L'utilisation de produits radioactifs, d'acrylamide et de formamide rendent les manipulations dangereuses. Cependant, des modifications de la méthode AFLP peuvent permettre de s'affranchir de la plupart de ces contraintes. Une technique dérivée de l'AFLP a été récemment décrite (49). Elle consiste à augmenter le nombre de bases sélectives lors de l'amplification, ce qui réduit le nombre de bandes amplifiées. Celles-ci peuvent alors être visualisées sur gel d'agarose sans marquage radioactif des amorces PCR. Il est aussi possible d'utiliser un marquage non-radioactif des gels AFLP, ce qui permet de développer la technique AFLP dans des laboratoires avec un minimum d'équipement et d'investissement.

Le manioc peut être cultivé dans des écosystèmes très différents (tropiques sous-humides ou zones semi-arides). Nos résultats montrent que les populations du pathogène sont génétiquement différenciées au niveau des ECZs. Il était donc important de caractériser à la fois les souches du pathogène et la gamme d'hôte différentielle qui seront utilisées dans un programme d'amélioration et ce dans chaque écozone. Actuellement et pour beaucoup de pathosystèmes, des cultivars différentiels et commerciaux sont utilisés pour mettre en évidence les interactions hôte-pathogène et ce à une échelle géographique donnée (153). Pour l'étude du pathosystème manioc-*Xam*, nous proposons une gamme d'hôte différentielle pour chaque ECZ, comprenant à la fois des variétés améliorées et des variétés commerciales. De plus, la caractérisation des pathotypes de *Xam* spécifiques aux différentes ECZs permet à l'améliorateur de sélectionner un nombre restreint de souches pour tester la résistance variétale. Au Venezuela, des pathotypes de *Xam* ont été caractérisés en utilisant cinq des cultivars de manioc appartenant

à notre gamme d'hôte (232). Avant de pouvoir proposer cette gamme d'hôte comme référence pour la caractérisation des pathotypes, il serait intéressant de la tester vis à vis d'un plus grand nombre de souches, tant de Colombie que d'autres pays d'Amérique du Sud et d'Afrique.

La technique d'inoculation que nous recommandons pour de telles études est la piqûre de tige, entre la troisième et la quatrième feuille sur des plants âgés d'un mois. Nous recommandons de travailler avec un minimum de cinq à dix répétitions (c'est-à-dire de cinq à dix plants par cultivar et par souche). Ceci implique une grande disponibilité en matériel végétal, et reste le facteur limitant dans l'étude de ce pathosystème. La technique d'inoculation sur vitroplants ou vitroplants sevrés, développée par Verdier (228) et Kpémoua (118) reste une autre alternative possible à l'étude de l'interaction *Xam*/manioc, mais elle exige un équipement et une infrastructure particuliers.

Un suivi continu de l'incidence de la maladie et de l'évolution de la structure des populations de *Xam*, implique des prospections coûteuses et parfois difficiles à réaliser. Les prospections réalisées au cours de ce travail (1996-1998) montrent qu'il existe des variations dans le temps et l'espace, à la fois de l'incidence de la maladie et de la diversité de l'agent pathogène.

La capacité d'un agent pathogène à contourner un ou des gènes de résistance peut être due soit aux changements dans la composition et la fréquence des pathotypes au sein d'une population, soit aux changements dans la structure haplotypique, ou bien encore à une combinaison des deux. Par conséquent, une information suivie et détaillée de la structure des populations de *Xam* est essentielle pour mieux comprendre la dynamique du pouvoir pathogène et pour développer des stratégies de lutte plus efficaces visant à réduire l'impact de la maladie.

Nous avons mis en évidence le rôle de l'hôte sur la structure des populations de *Xam*. L'effet de l'hôte sur la structure des populations peut être "actif" comme il a été déjà démontré dans le cas de *X. c. pv. vesicatoria*, où des changements de race sont apparus après l'inoculation d'une souche sur une variété résistante (58, 116). Il peut aussi être "passif" et dû aux caractéristiques biologiques de l'agent pathogène.

Selon l'hypothèse de Vavilov (226), une espèce présente un niveau de diversité plus élevé dans son centre d'origine. La diversité est significativement moins élevée lorsque l'espèce est localisée dans les limites géographiques de l'aire d'origine. Si nous faisons la synthèse des études de diversité de *Xam* dans trois pays d'Amérique du Sud (Colombie, sud-est du Vénézuéla

et sud-est du Brésil), nous constatons que la variabilité de *Xam* est très élevée dans ces trois régions. Elle est liée aux conditions de culture de la plante hôte et au fait que de nombreux cultivars améliorés et locaux soient cultivés dans un même champ. Leur nombre est très élevé et en constante évolution (environ 7000 cultivars recensés dont la moitié sont d'origine Brésilienne) (98). Chaque année, en Amazonie, les agriculteurs produisent et sélectionnent eux-mêmes de nouveaux cultivars (54, 68).

Le système d'information géographique (SIG) développe des outils informatiques et statistiques très performants qui peuvent combiner différentes informations comme: l'ensemble des données édaphoclimatiques d'une région, les données sur la diversité d'un agent pathogène ainsi que les données sur la plante hôte (répartition géographique, diversité). Jusqu'à présent, peu d'études ont utilisé l'ensemble de ces informations pour prévoir quelles seraient les aires de diversité d'un agent pathogène, l'incidence de la maladie dans des régions encore non étudiées. La plupart des études développées concernent l'incidence de la maladie et la distribution de l'agent pathogène à l'intérieur d'un champ (31, 125, 201, 219). Le SIG et de la géostatistique ont été utilisés pour le développement et la validation de programmes de lutte contre des maladies des plantes (162, 163). La technique développée par Kriging (120) est une technique qui permet de cartographier la distribution du pathogène dans une région déterminée, basée sur un échantillonnage limité. En combinant ces techniques avec le SIG, il est donc possible, à une échelle géographique donnée, de développer un programme d'étude des risques d'infection par tel ou tel agent pathogène. Cela a été réalisé pour un complexe de virus au Mexique sur plusieurs cultures (tabac, tomate, poivron) (163).

Pour le pathosystème manioc - *Xam* et dans le but de réaliser un programme d'évaluation des risques, nous proposons de développer la stratégie proposée par Nelson *et al.* (162, 163). En premier lieu, il faut identifier les champs de manioc et les localiser sur des cartes où le centre du champ est estimé avec une erreur approximative. Les facteurs qui ont une influence sur l'incidence, la sévérité et la diversité de la maladie et de l'agent pathogène, doivent être identifiés. Dans le cas de la bactériose du manioc, plusieurs variables doivent être évaluées, afin d'établir une corrélation entre ces variables et la présence et l'incidence de la maladie. Ces variables sont: le nombre de cultivars cultivés (dans le chapitre 3 nous avons mis en évidence l'effet du nombre de cultivars cultivés sur la diversité de *Xam*), les caractéristiques climatiques comme les précipitations, les températures maximales et minimales qui ont une influence sur la sévérité de la maladie (dont l'effet a pu être mis en évidence dans le chapitre 3.4) et la présence

et diversité de l'agent pathogène dans d'autres champs de la même ECZ (problèmes de migration intra-ECZ). Le principal objectif sera le développement de cartes de prévision de la présence de la bactériose vasculaire du manioc à l'échelle du continent sud-américain.

6 REFERENCES

6 REFERENCES

1. ADHIKARI, T. B., C. M. VERA CRUZ, Q. ZHANG, R. J. NELSON, D. Z. SKINNER, T. W. MEW, and J. E. LEACH. 1995. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 966-971.
2. ALIZADETH, A., M. ARLAT, A. SARRAFI, C. A. BOUCHER, and G. BARRAULT. 1997. Restriction fragment length polymorphism analyses of Iranian strains of *Xanthomonas campestris* from cereals and grasses. *Plant Dis.* 81: 31-35.
3. ALLEM, A. C. 1987. *Manihot esculenta* is a native of the neotropics. *Plant. Genet. Resourc. Newsl (int. Board Plant Genet. Resourc)* 71: 22-24.
4. ALLEM, A. C. 1994. The origin of *Manihot esculenta* Crantz (*Euphorbiaceae*). *Genet. Res. Crop.* 41: 133-150.
5. ALVES, M. L. B., and A. TAKATSU. 1984. Variabilidade em *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Fitopatol. Brasil* 9: 485-494.
6. ANDRIVON, D. 1993. Nomenclature for pathogenic and virulence: The need for precision. *Phytopathology* 83: 889-890.
7. ARDALES, E. Y., H. LEUNG, C. M. VERA CRUZ, T. W. MEW, J. E. LEACH, and R. J. NELSON. 1996. Hierarchical analysis of spatial variation of the rice bacterial blight pathogen across diverse agroecosystems in the Philippines. *Phytopathology* 86: 241-252.
8. ASSIGBETSE, K., V. VERDIER, K. WYDRA, K. RUDOLPH, and J. P. GEIGER. Genetic Variation of the cassava bacterial blight pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, originating from different ecoregions I Africa. IX Int. Conf. Plant Path. Bacteria ed., Madras, India, 1998, pp. 223-229.
9. ASSIGBETSE, K. B., D. FERNANDEZ, M. P. DUBOIS, and J. P. GEIGER. 1994. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Phytopathology* 84: 622-626.
10. BARRET, J. A. The dynamics of genes in populations. In: *Populations of Plant Pathogens. Their Dynamics and Genetics*. Ed. M. S. Wolfe and C. E. Caten. Oxford. Blackwell Scientific Publications, 1987, pp. 39-53.
11. BEECHING, J. R., P. MARMEY, M. C. GAVALDA, M. NOIROT, H. R. HAYSOM, M. A. HUGHES, and A. CHARRIER. 1993. An assessment of genetic diversity within a collection of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm using molecular markers. *Annals of Botany* 72: 515-520.
12. BERTHIER, Y., V. VERDIER, J. L. GUESDON, D. CHEVRIER, J. B. DENIS, G. DECOUX, and M. LEMATTRE. 1993. Characterization of *Xanthomonas campestris* pathovars by rRNA gene restriction patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 851-859.
13. BOHER, B. Etude des relations entre le manioc (*Manihot esculenta* Crantz) et deux parasites bactériens: *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* et *Xanthomonas campestris* pv. *cassavae*. Th. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, 1996, pp. 110.

14. BOHER, B., and C. A. AGBOLI. 1992. La bactériose vasculaire du manioc au Togo: caractérisation du parasite, répartition géographique et sensibilité variétale. *L'Agro Trop*46: 131-136.
15. BOHER, B., K. KPEMOUA, M. NICOLE, J. LUISETTI, and J. P. GEIGER. 1995. Ultrastructure of interactions between cassava and *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*; cytochemistry of cellulose and pectin degradation in a susceptible cultivar. *Phytopathology*85: 777-788.
16. BOHER, B., and V. VERDIER. 1995. Cassava bacterial blight in Africa: The state of knowledge and implications for designing control strategies. *Afr. Crop Sci. J.* 2: 1-5.
17. BONAS, U., J. CONRADS-STRAUCH, and I. BALBO. 1993. Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene *avrBs3*. *Mol. Gen. Genet.* 238: 261-269.
18. BONAS, U., R. E. STALL, and B. STASKAWICZ. 1989. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet.* 218: 127-136.
19. BONAS, U., and G. VAN DEN ACKERVEKEN. Bacterial *hrp* and avirulence genes are key determinants in plant-pathogen interactions. New York: Aerial plant surface microbiology, 1996.
20. BONDAR, G. 1912. Uma nova molestica bacteriana das hastes da mandioca. *Chacaras Quintaes* 5: 15-18.
21. BORCHARDT, D. S., H. G. WELZ, and H. H. GEIGER. 1998. Genetic structure of *Setosphaeria turcica* populations in tropical and temperate climates. *Phytopathology*88: 322-329.
22. BOS, L., and J. E. PARLEVLIET. 1995. Concepts and terminology on plant/pest relationships: toward consensus in plant pathology and crop protection. *Ann. Rev. Phytopathol.* 33: 69-102.
23. BRAGARD, C., E. SINGER, A. ALIZADEH, L. VAUTERIN, H. MARAITE, and J. SWINGS. 1997. *Xanthomonas translucens* from small grains : Diversity and phytopathological relevance. *Phytopathology* 87: 1111-1117.
24. BRAGARD, C., V. VERDIER, AND H. MARAITE. 1995. Genetic diversity among *Xanthomonas campestris* strains pathogenic for small grains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1020-1026.
25. BROWN, J. K. M. 1996. The choice of molecular markers methods for population genetic studies of plant pathogens. *New Phytol.* 133: 183-195.
26. BURKILL, I. H. A dictionary of the economic products of the Malay Peninsula. Malaysia.: Ministry of Agriculture and Cooperatives, 1966.
27. CANTEROS, B., G. MINSAVAGE, U. BONAS, D. PRING, and R. STALL. 1991. A gene from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines avirulence in tomato is related to *avrBs3*. *Mol. Plant Microbe Interac.* 4: 628-632.
28. CANTEROS, B. I., G. V. MINSAVAGE, J. B. JONES, and R. E. STALL. 1995. Diversity of plasmids in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85: 1482-1486.

29. CARVALHO, L. J. C. B., B. A. SHAAL, and W. M. G. FUKUDA. 1998. Genetic diversity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in a germplasm collection assessed by RAPD markers. *Revista Brasileira de Mandioca* 17: 13.
30. CATEN, C. E. The concept of race in plant pathology. Oxford.: Blackwell Scientific Publications, 1987.
31. CHELLEMI, D. O., K. G. ROHRBACH, R. S. YOST, and R. M. SONODA. 1988. Analysis of the spatial pattern of plant pathogens and diseased plants using geostatistics. *Phytopathology* 78: 221-226.
32. CHOI, S. H., C. M. VERA, and J. E. LEACH. 1998. Distribution of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* DNA modification systems in Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1663-1668.
33. CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report., 1998.
34. CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report., 1976.
35. CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report., 1979.
36. CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report., 1992.
37. CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report., 1978.
38. CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report., 1977.
39. CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report., 1974.
40. CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report., 1975.
41. CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report., 1983.
42. CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report., 1996.
43. CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report., 1995.
44. CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report., 1994.
45. CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report., 1971.
46. CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report., 1993.
47. CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report., 1980.
48. CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report., 1997.
49. CLERC, A., C. MANCEAU, and X. NESME. 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* *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1180-1187.
50. COCK, J. H. 1982. Cassava: a basic energy source in the tropics. *Science* 218: 755-762.
51. COCK, J. H. Cassava: new potential for a neglected crop. USA, 1985.
52. COCK, J. H., D. FRANFLIN, G. SANDOVAL, and P. JURI. 1979. The ideal cassava plant for maximum yield. *Crop Sci.* 19: 271-279.
53. COHEN, J. I., J. B. ALCORN, and C. S. POTTER. 1991. Utilisation and conservation of genetic resources: international projects for sustainable agriculture. *Econ. Bot* 45: 190-199.

54. COLOMBO, C. Etude de la diversité génétique de maniocs américains (*Manihot esculenta* Crantz) par les marqueurs moléculaires (RAPD et AFLP). Th. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 1997, pp. 144.
55. COOK, D., E. BARLOW, and L. SEQUEIRA. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specific virulence and the hypersensitive response. *Mol. Plant Microbe Interac.* 2: 113-121.
56. CORREA-VICTORIA, F. J., and R. S. ZEIGLER. 1993. Pathogenic variability in *Pyricularia grisea* at a rice Blast "Hot Spot" breeding site in Eastern Colombia. *Plant Dis.* 77: 1029-1035.
57. CUPPELS, D. A., and T. AINSWORTH. 1995. Molecular and physiological characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* strains that produce the phytotoxin Coronatine. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3530-3536.
58. DAHLBECK, D., and R. E. STALL. 1979. Mutations for change of races in cultures of *Xanthomonas vesicatoria*. *Phytopathology* 69: 634-636.
59. DANIEL, J. F. Contribution à l'étude de la biologie de *Xanthomonas campestris* pathovar *manihotis* (Arthaud-Berthet et Bondar) Starr agent responsable de la bactériose vasculaire du manioc, *Manihot esculenta* Crantz. Th. Université de Paris-Sud, 1991, pp. 177.
60. DANIEL, J. F., and B. BOHER. 1985. Etude des modes de survie de l'agent causal de la bactérie vasculaire vasculaire du manioc, *Xanthomonas campestris* pathovar *manihotis*. *Agronomie* 5: 339-246.
61. DANIEL, J. F., B. BOHER, and F. KOHLER. 1981. Les maladies bactériennes du manioc (*Manihot esculenta* Crantz) en République Populaire du Congo et en République Centrafricaine. *Agronomie* 9: 751-758.
62. DANIEL, J. F., B. BOHER, and N. NIKOUKA. Insect dissemination of *Xanthomonas manihotis* to cassava in the people's Republic of Congo. In: *Tropical Root Crop Research Strategies for the 1980's*. Ed. Terry, Oduro and Caveness. 1980, pp. 66-68
63. DE BRUIJN, F. J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2180-2187.
64. DE PARASIS, J., and D. A. ROTH. 1990. Nucleic acid for identification of phytobacteria: Identification of genus-specific 16s rRNA sequences. *Phytopathology* 80: 618-621.
65. DYE, D. W., J. F. BRADBURY, M. GOTO, A. C. HAYWARD, R. A. LELLIOTT, and M. N. SCHROTH. 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Rev. Plant Pathol.* 59: 153-168.
66. ELANGO, F., and J. C. LOZANO. 1978. Influencia de la temperatura con relación a la severidad de daños causados por *Xanthomonas manihotis* en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Fitopatologia Colombiana* 2: 118-119.
67. ELANGO, F., and J. C. LOZANO. 1981. Pathogenic variability of *Xanthomonas manihotis*, the causal agent of cassava bacterial blight. *Fitopatologia Brasileira* 6: 57-63.

68. ELIAS, M., O. PANAUD, D. B. MCKEY, and T. ROBERT. 1998. Traditional cultivation of cassava among ameridiand: Consequences on genetic diversity assessed by AFLP markers. *Revista Brasileira de mandioca* 17 (Abst.).
69. EXCOFFIER, L., P. E. SMOUSE, and J. M. QUATTRO. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
70. FAO. Food and agriculture Organization of the United Nations (FAO), Agricultural commodity Projections, FAO, Rome. 1998.
71. FARGETTE, D., M. JEGER, C. FAUQUET, and L. D. C. FISHPOOL. 1993. Analysis of temporal disease Progress of African Cassava Mosaic Virus. *Phytopathology* 84: 91-98.
72. FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 9: 366-369.
73. FELSENSTEIN, J. 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.
74. FENSELAU, S., and U. BONAS. 1995. Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encodes eight proteins with similarity to components of the *hrp*, *ysc*, *spa*, and *fli* secretion systems. *Mol. Plant Microbe Interac.* 8: 845-854.
75. FESSEHAIE, A. Biochemical/physiological characterization and detection methods of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. (Berthet-Bondar) Dye 1978, the causal organism of cassava bacterial blight. Th. University of Göttingen, Germany, 1997.
76. FLEMING, R. A., AND C. O. PERSON. 1982. Disease control through use of multilines: a theoretical contribution. *Phytopathology* 68: 1230-1233.
77. FLOR, H. H. 1995. Host-parasite interaction in flax rust-oats genetics and other implications. *Phytopathology* 45: 680-685.
78. FREGENE, M., F. ANGEL, R. GOMEZ, F. RODRIGUEZ, P. CHAVARRIAGA, W. ROCA, J. TOHME, and M. BONIERBALE. 1997. A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor. Appl. Genet.* 95: 431-441.
79. FREGENE, M. A., J. VARGAS, J. IKEA, F. ANGEL, J. TOHME, R. A. ASIEDU, M. O. AKORODA, and W. M. ROCA. 1994. Variability of chloroplast DNA and nuclear ribosomal DNA in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its wild relatives. *Theor. Appl. Genet.* 89: 719-727.
80. GABRIEL, D. W., M. T. KINGSLEY, J. E. HUNTER, and T. GOTTWALD. 1989. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex hasse) and *X. phaseoli* (ex smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. *International J. Syst. Bacteriol.* 39: 14 -22.
81. GAGNEVIN, L. Analyse de la diversité génétique de *Xanthomonas* pv. *mangiferaeindicae* et sa signification dans le pouvoir pathogène et la biologie de la bactérie. Implications dans l'épidémiologie de la maladie des taches noires du manguier à l'île de la Réunion. Th. Institut National Agronomique de Paris-Grignon, Paris, 1998.
82. GEORGE, M. L. C., M. BUSTAMAM, W. T. CRUZ, J. E. LEACH, and R. J. NELSON. 1997. Movement of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in southeast asia detected using PCR-based DNA fingerprinting. *Phytopathology* 87: 302-309.

83. GONZÁLEZ, M., R. RODRIGUEZ, M. E. ZAVALA, J. L. JACOBO, F. HERNANDEZ, J. ACOSTA, O. MARTINEZ, and J. SIMPSON. 1998. Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and Molecular markers. *Phytopathology* 88: 292-299.
84. GROPPE, K., I. SANDERS, A. WIEMKEN, and T. A. BOLLER. 1995. A microsatellite marker for studying the ecology and diversity of fungal endophytes (*Epichloe* spp.) in grasses. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3943-3949.
85. GROTH, J. V., and A. P. ROELFS. 1987. The concept and measurement of phenotypic diversity in *Puccinia graminis* on wheat. *Phytopathology* 77: 1395-1399.
86. GROUSSON, F., J. PAGES, and B. BOHER. 1990. Etude de la variabilite d'un agent pathogene, *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, par l'analyse factorielle multiple. *Agronomie* 4: 627-640.
87. HAHN, S. K. Breeding of cassava for resistance to cassava mosaic disease and bacterial blight in Africa. Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium, 1978.
88. HAHN, S. K., A. K. HOWLAND, and E. R. TERRY. 1980. Correlated resistance of cassava to mosaic and bacterial blight diseases. *Euphytica* 29: 305-311.
89. HAHN, S. K., and R. L. THEBERGE. Techniques and advances in breeding cassava for disease resistance in Africa In. *Cassava Breeding: a multidisciplinary review*. CIAT, 1987.
90. HAHN, S. K., and R. J. Williams. Rapport au Commissaire d'Etat et d'Agriculture, République du Zaïre. Ibadan, IITA, 1973.
91. HALDANE, J. B. S. 1924. A mathematical theory of natural and artificial selection. *Transactions of the Cambridge Philosophical Society* 23: 19-41.
92. HAMELIN, R. C., M. DUSABENYAGASANI, and K. ET-TOUIL. 1998. Fine-level genetic structure of white pine blister rust populations. *Phytopathology* 88: 1187-1191.
93. HANTULA, J., M. DUSABENYAGASANI, and R. C. HAMELIN. 1996. Random amplified microsatellites (RAMS) - a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *Euro. J. For Path.* 26: 159-166.
94. HANTULA, J., A. LILJA, and P. PARIKKA. 1997. Genetic variation and host specificity of *Phytophthora cactorum* isolated in Europe. *Mycol. Res.* 101: 565-572.
95. HARLAN, J. R. 1971. Agricultural origin: centers and noncenters. *Science (Wash. DC)* 174: 468-474.
96. HE, S. Y., H. C. HUANG, and A. COLLMER. 1993. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin (*ps*) - a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* 73: 1255-1266.
97. HENDSON, M., D. C. HILDEBRAND, and M. N. SCHROTH. 1992. Relatedness of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *Pseudomonas syringae* pv. *antirrhini*. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 455-464.
98. HERSHEY, C., C. IGLESIAS, M. IWANAGA, and J. TOHME. Definition of a core collection for cassava. In : *International network for cassava genetic resources*. Cali, Colombia: PGRI, Romem, International Crop Network, 1994.
99. HWANG, I., and S. M. LIM. 1998. Pathogenic variability in isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. *Korean Journal of Plant Pathology* 14: 19-22.

100. IGLESIAS, C. Estructura general de los programas de mejoramiento de yuca en América Latina. En Interfase entre los programas de mejoramiento, los campos de los agricultores y los mercados de la yuca en Latinoamérica. Ed. CIAT, Cali, 1994.
101. JACCARD, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles 44:223-270.
102. JANSSEN, P., R. COOPMAN, G. HUYS, J. SWINGS, M. BLEEKER, P. VOS, M. ZABEAU, and K. KERSTERS. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. Microbiology 142: 1881-1893.
103. JAUNET, T., G. LAGUERRE, P. LEMANCEAU, R. FRUTOS, and J. L. NOOTTEGHEM. 1995. Diversity of *Pseudomonas fuscovaginae* and other fluorescent Pseudomonads isolated from disease rice. Phytopathology 85: 1534-1541.
104. JENNINGS, J. *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae). England: Longman Scientific and Technical, 1995.
105. JONES, A. L., J. L. NORELLI, and G. R. EHRET. 1991. Detection of streptomycin-resistant *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* in Michigan apple orchards. Plant Dis. 75: 529-531.
106. JONES, J. B., R. E. STALL, and H. BOUZAR. 1998. Diversity among Xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. Annu Rev Phytopathol 36: 41-58.
107. JONES, M. J., and L. D. DUNKLE. 1993. Analysis of *Cochliobolus carbonum* races by PCR amplification with arbitrary and gene-specific primers. Phytopathology 83: 366-370.
108. JONES, W. O. Manioc in Africa. Stanford University press, CA, USA, 1969.
109. JORGE, V., M. FREGENE, M. C. DUQUE, J. TOHME, and V. VERDIER. 1999. Genetics of resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Cassava. Theor. Appl. Genet. Submitted.
110. JOSEPH, J., and F. ELANGO. 1991. The status of cassava bacterial blight caused by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* in Trinidad. J. Phytopathol. 133: 320-327.
111. KAWANO, K., A. AMATA, P. DAZA, and M. RIOS. 1978. Factors affecting efficiency in hybridization and selection in cassava. Crop Sci. 18: 373-376.
112. KEARNEY, B., and B. J. STASKAWICZ. 1990. Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*. Nature 346: 385-386.
113. KINGSLEY, M. T., D. W. GABRIEL, G. C. MARLOW, and P. D. ROBERTS. 1993. The *opsX* locus of *Xanthomonas campestris* affects host range and biosynthesis of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide. J. Bacteriol. 5839-5850.
114. KIYOSAWA, S. 1977. Some examples of pest and disease epidemics in Japan and their causes. Ann. New York Acad. Sci. 287: 35-44.
115. KLEMENT, B. Z., and R. N. GOODMAN. 1967. The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogen. Ann. Rev. Phytopathol. 5: 17-44.
116. KOUSIK, C. S., and D. F. RITCHIE. 1996. Race Shift in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* within a Season in Field-Grown Pepper. Phytopathology 86: 952-958.

117. KPÉMOUA, K., B. BOHER, M. NICOLE, P. CALATAYUD, and J. P. GEIGER. 1996. Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Can. J. Microbiol* 42: 1131-1143.
118. KPÉMOUA, K. E. Etude comparative du développement de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* chez des variétés de manioc sensibles et résistantes. Approches histologique, ultrastucturale et cytochimique des mécanismes de la pathogénèse. Th. Faculté des sciences et techniques. Th. Université de Nantes, 1995, pp. 95.
119. KREBS, C. J. Ecología, Estudio de la distribución y abundancia. Mexico, 1985.
120. KRIGE, D. 1996. Two dimensional weighted moving average trend surfaces for ore-evaluation. *J. S. Afr. Inst. Min. Metall.* 66: 13-38.
121. LAZO, G. R., and D. W. GABRIEL. 1987. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology* 77: 448-453.
122. LEACH, J. E., M. L. RHOADS, C. M. VERA CRUZ, F. F. WHITE, T. W. MEW, and H. LEUNG. 1992. Assessment of genetic diversity and population structure of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* with a repetitive DNA element. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2188-2195.
123. LEACH, J. E., and F. F. WHITE. 1996. Bacterial avirulence genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 153-179.
124. LEACH, J. E., F. F. WHITE, M. L. RHOADS, and H. A. LEUNG. 1990. repetitive DNA sequence differentiates *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* from other pathovars of *X. campestris*. *Mol. Plant Microbe Interac.* 3: 238-246.
125. LECOUSTRE, R., D. FARGETTE, C. FAUQUET, and P. DE REFFYE. 1989. Analysis and mapping of the spatial spread of African cassava mosaic virus using geostatics and the kriging technique. *Phytopathology* 79: 913-920.
126. LEFEVRE, F. Ressources génétiques et amélioration du manioc, *Manihot esculenta* Crantz, en Afrique. Th. Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris, 1988 144 pp.
127. LEITE, R. P., S. P. EGEL, and R. E. STALL. 1994. Genetic analysis of hrp-related DNA sequences of *Xanthomonas campestris* strains causing disease of citrus. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1078-1086.
128. LEONARD, K. J., and R. J. CZOCHOR. 1980. Theory of genetic interactions among populations of plants and their pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18: 237-58.
129. LEU, L. S., and C. T. CHEN. 1972. Bacterial wilt of cassava caused by *Xanthomonas manihotis*. *Plant Protection Bulletin (Taiwan)* 14: 17-26.
130. LEUNG, H., R. J. NELSON, and J. E. LEACH. 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *Adv. Plant Pathol.* 10: 157-205.
131. LEVY, M., F. J. CORREA-VICTORIA, R. S. ZEIGLER, S. XU, and J. E. HAMER. 1993. Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. *Phytopathology* 83: 1427-1433.
132. LEVY, M., J. ROMAO, M. A. MARCHETTI, and J. E. HAMER. 1991. DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. *The plant Cell* 3: 95-102.

133. LOUWS, F. J., D. W. FULBRIGHT, C. T. STEPHENS, and F. J. DE BRUIJN. 1995. Differentiate of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85: 528-536.
134. LOZANO, J. C. Bacterial Blight of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Colombia: etiology, epidemiology, and control. Th. University of Wisconsin, Wisconsin. 1972, pp. 114.
135. LOZANO, J. C. 1975. Bacterial blight of cassava. *PANS* 21: 38 -43.
136. LOZANO, J. C. 1986. Cassava bacterial blight: a manageable disease. *Plant Dis.* 70: 1089-1093.
137. LOZANO, J. C., and A. BELLOTI. *Erwinia carotovora* var. *carotovora* causal agent of bacterial stem rot of cassava: etiology, epidemiology and control. In: Cassava bacterial blight: past, present and future. Ed. Terry, E. R., G. J. Persley, and S. Cook. 1978.
138. LOZANO, J. C., and R. H. BOOTH. Enfermedades de la yuca. En Yuca: Investigación, producción y utilización. Ed. Dominguez, C. E. 1984.
139. LOZANO, J. C., D. BYRNE, and A. BELLOTI. 1980. Cassava: ecosystem relationships and their influence on breeding strategy. *Tropical pest Management* 26: 180-187.
140. LOZANO, J. C., and R. LABERRY. 1982. Screening for resistance to cassava bacterial blight. *Plant Dis.* 66: 316-318.
141. LOZANO, J. C., and L. SEQUEIRA. 1974. Bacterial blight of cassava in Colombia : Epidemiology and control. *Phytopathology* 64: 83 -88.
142. MAES, M., P. GARBEVA, and O. KAMOEN. 1996. Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leaf streak using rDNA spacer sequences and Polymerase chain. *Phytopathology* 86: 63-69.
143. MAJER, D., R. MITHEN, B. G. LEWIS, P. VOS, and R. P. OLIVER. 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycol. Res.* 100: 1107-1111.
144. MARAITE, H. *Xanthomonas campestris* pathovars on cassava, cause of bacterial blight and bacterial necrosis. London, UK: Chapman and Hall Ltd., 1993.
145. MARAITE, H., and J. A. MEYER. 1975. *Xanthomonas manihotis* (Arthaud-Berthet) Starr, causal agent of bacterial wilt, blight and leaf spots of cassava in Zaire. *PANS* 21: 27 -36.
146. MARAITE, H., and J. WEYNS. Distinctive physiological, biochemical and pathogenic characteristics of *Xanthomonas manihotis* and *X. cassavae*. In: Diseases of tropical food crops ed. Louvain-la-Neuve, Belgique, Université Catholique de Louvain, 1979, pp. 358-368.
147. MARAITE, H., J. WEYNS, O. YMKWAN, D. LIPEMBRA, and D. PERREAUX. Physiological and pathogenic variations in *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1981.
148. MAYNARD SMITH, J. M., N. H. SMITH, M. O'ROURKE, and B. G. SPRATT. 1993. How clonal are bacteria. *Proc Natl Acad Sci.* 90: 4384-4388.
149. MCDERMOTT, J. M., and B. A. MCDONALD. 1993. Gene flow in plant pathosystems. *Annu Rev. Phytopathol.* 31: 353-373.

150. MCDONALD, B. A., and J. P. MARTINEZ. 1990. DNA restriction fragment length polymorphisms among *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) isolated from a single wheat field. *Phytopathology* 80: 1368-1373.
151. MCDONALD, B. A., and J. M. MCDERMOTT. 1993. Population genetics of plant pathogenic fungi. *Bioscience* 43: 311-319.
152. MCDONALD, B. A., J. M. MCDERMOTT, R. W. ALLARD, and R. K. WEBSTER. 1989. Coevolution of host and pathogen populations in the *Hordeum vulgare* - *Rhynchosporium secalis* pathosystem. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 3924-3927.
153. MEW, T. W. 1987. Current status and future prospects of research on bacterial blight of rice. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25: 359-82.
154. MEW, T. W., C. M. VERA CRUZ, and E. S. MEDALLA. 1992. Changes in the race frequency of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in response to rice cultivars planted in the Philippines. *Plant Dis.* 76: 1029-1032.
155. MICHELMORE, R. W., and S. H. HULBERT. 1987. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25: 383-404.
156. MINSAVAGE, G. V., B. I. CANTEROS, and R. E. STALL. 1990. Plasmid-mediated resistance to streptomycin in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 80: 719-723.
157. MOMOL, M. T., E. A. MOMOL, W. F. LAMBOY, J. L. NORELLI, S. V. BEER, and H. S. ALDWINCKLE. 1997. Characterization of *Erwinia amylovora* strains using random amplified polymorphic DNA fragments (RAPDs). *J. Appl. Microbiol.* 82: 389-398.
158. MÜLLER, K., J. M. MCDERMOTT, M. S. WOLFE, and E. LIMPET. 1996. Analysis of diversity in populations of plant pathogens: the barley powdery mildew pathogen across Europe. *Euro. J. Plant Pathol.* 102: 385-395.
159. NASSAR, N. M. A. 1978. Conservation of the genetic resources of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): determination of wild species with emphasis on probable origin. *Econ. Bot.* 32: 311-320.
160. NEI, M., AND W. H. LI. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
161. NEI, M., and F. TAJIMA. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97: 145-163.
162. NELSON, M. N., T. V. ORUM, R. JAIME-GARCIA, and A. NADEEM. 1999. Applications of geographic information systems and geostatics in plant disease epidemiology and management. *Plant Dis.* 83: 308-319.
163. NELSON, M. R., R. FELIX-GASTELUM, T. V. ORUM, L. J. STOWELL, and D. E. MYERS. 1994. Geographic information systems and geostatics in the design and validation of regional plant virus management programs. *Phytopathology* 84: 898-905.
164. NELSON, R. J., M. R. BARAOIDAN, C. M. VERA CRUZ, I. V. YAP, J. E. LEACH, T. W. MEW, and H. LEUNG. 1994. Relationship between phylogeny and pathotype for the bacterial blight pathogen of rice. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3275-3283.
165. NELSON, R. R. 1978. Genetics of host plant resistance of wheat to *Septoria nodorum*. *Crop Sci.* 22: 771-773.

166. NESME, X., V. STEENACKERS, C. PICARD, M. MENARD, S. RIDE, and M. RIDE. 1994. Differential host-pathogen interaction among clones of poplar and strains of *Xanthomonas populi* pv. *populi*. *Phytopathology* 84: 101-107.
167. NOTTEGHEM, J. L., M. CHATENET, and D. POUZET. 1980. Mise en évidence de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Agent du deperissement du manioc en Côte d'Ivoire. *Agronomie Tropicale* 35: 189-191.
168. NYANGO, A. K. Cassava bacterial Blight in four regions of the United Republic of Tanzania (a preliminary survey). London.: Centre for Overseas Pest Research, 1979.
169. NYIIRA, Z. M., and G. W. OTIM-NAPE. Cassava bacterial blight and minor diseases of cassava in Uganda. London: Centre for Overseas Pest Research, 1979.
170. OLIVIERI, I., D. COUVERT, and P. GOUYON. 1990. The genetics of transient populations: research at the metapopulation level. *Trends Ecol. Evol.* 5: 207-210.
171. ONYANGO, D. M., and A. H. RAMOS. La bactériose du manioc au Kenya. London: Centre for Overseas Pest Research, 1978.
172. Otim-Nape, G. W. 1980. Cassava Bacterial Blight in Uganda. *Trop. Pest Manag.* 26: 274-277.
173. OU, S. H. 1980. Pathogen variability and host resistance en rice blast disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18: 167-87.
174. PARLEVLIET, J. E. 1979. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Ann. Rev. Phytopathol.* 17: 203-222.
175. PAZ BRIZ, F. R. Country presentation: Ecuador. Ottawa, Canada: The international exchange and testing of cassava germ plasm. International Development Research Centre, 1975.
176. PERREAUX, D., H. MARAITE, and J. A. MEYER. 1986. Detection of 3(methylthio) propionic acid in cassava leaves infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 28: 323-328.
177. PERREAUX, D., E. R. TERRY, and G. J. PERSLEY. Etude des méthodes de criblage pour la résistance du manioc à la bactériose. Dans: La bactériose du manioc en Afrique. Ibadan, IITA.: Le passé, le présent et l'avenir. Ottawa. IDRC, 1978.
178. PERSLEY, G. J. Distribution and importance of cassava bacterial blight in Africa. London: Centre for Overseas Pest Research. 36pp., 1976.
179. PERSLEY, G. J. Distribution and importance of cassava bacterial blight in Africa: IITA, 1977.
180. PERSLEY, G. J. 1979. Studies on the survival and transmission of *Xanthomonas manihotis* on cassava seed. *Annals of Applied Biology* 93: 159-166.
181. PERSON, C., J. V. GROTH, and O. M. MYLYK. 1976. Genetic change in host parasite populations. *Ann Rev. Phytopathol.* 14: 177-188.
182. PETES, T. D., and HILL, C.W. 1988. Recombination between repeated genes in microorganisms. *Annu. Rev. Genet.* 22: 147.
183. PILET, F. Diversité génétique et variabilité du pouvoir pathogène de *Xanthomonas albilineans*, agent causal de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre. In: Rapport de Stage de DEA. Université de Rennes I, 1998, pp. 25.

184. POOLER, M. R., D. F. RITCHIE, and J. S. HARTUNG. 1996. Genetic Relationships among Strains of *Xanthomonas fragariae* Based on Random Amplified Polymorphic DNA PCR, Repetitive Extragenic Palindromic PCR, and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR Data and Generation of Multiplexed PCR Primers Useful for the Identification of This Phytopathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3121-3127.
185. POSWAL, M. A. T. 1991. New races of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Smith) Dye in Nigeri. *Coton et fibres* 46: 159-163.
186. POUNDZOU, J. Contribution à la mise au point de techniques de lutte contre la bactériose vasculaire dans le cadre d'un parc à multiplication végétative de manioc. Brazzaville, Congo: IDR, 1987.
187. PRUVOST, O., J. S. HARTUNG, E. L. CIVEROLO, C. DUBOIS, and X. PERRIER. 1992. Plasmid DNA fingerprints distinguish pathotypes of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* the causal agent of citrus bacterial canker disease. *Phytopathology* 82: 485-490.
188. RADEMAKER, J. L. W., and F. J. DE BRUIJN. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. <http://pilot.msu.edu/user/deBruijn/dna1-4.htm>, 1998.
189. REICHEL DOLMATOFF, G. 1957. Momil: a formative sequence from the Sinu Valley, Colombia. *Am. Antiquity* 22: 226-234.
190. RENVOIZE, B. S. 1973. The area of origin of *Manihot esculenta* as a crop plant: a review of the evidence. *Econ. Bot.* 26: 352-360.
191. RESTREPO, S., T. VALLE, M. C. DUQUE, and V. VERDIER. 1999. Assessing genetic variability among Brazilian strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* through RFLP and AFLP analyses. *Can. J. Microbio.* In press.
192. ROA, A. C., M. M. MAYA, M. C. DUQUE, J. TOHME, A. C. ALLEM, and M. W. BONIERBALE. 1997. AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. *Theor. Appl. Genet.* 95: 741-750.
193. ROBBS, C. F., R. D. L. RIBEIRO, O. KIMURA, and J. AKIBA. 1972. Variações em *Xanthomonas manihotis*. *Rev. Soc. Brasil. Pitopatologia* 5: 67-75.
194. ROBERTS, P. D., N. C. HODGE, H. BOUZAR, J. B. JONES, R. E. STALL, R. D. BERGER, and A. R. CHASE. 1998. Relatedness of strains of *Xanthomonas fragariae* by restriction fragment length polymorphism, DNA-DNA reassociation, and fatty acid analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3961-3965.
195. ROBINSON, R. A. 1969. Disease resistance terminology. *Rev. Plant Pathol.* 50: 233-239.
196. ROGERS, D. J., and S. G. APPAN. *Manihot manihotoides* (Euphorbiaceae). Ed.: Organization for Flora Neotropica and Hafner, New York 1973.
197. ROHLF, F. J. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and multivariate Analysis System. New York, 1994.
198. ROSEWICH, U. L., R. E. PETTWAY, B. A. MCDONALD, R. R. DUNCAN, and R. A. FEDERIKSEN. 1998. Genetic structure and temporal dynamics of a *Colletotrichum graminicola* population in a sorghum disease nursery. *Phytopathology* 88: 1087-1093.

199. ROTT, P., I. S. MOHAMED, P. KLETT, D. SOUPA, A. DE SAINT-ALBIN, P. FELDMANN, and P. LETEOURMY. 1997. Resistance to Leaf Scald disease is associated with limited colonization of sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans*. *Phytopathology* 87: 1202-1213.
200. ROTT, P. C., L. COSTET, M. J. DAVIS, R. FRUTOS, and D. W. GABRIEL. 1996. At Least Two Separate Gene Clusters Are Involved in Albicidin Production by *Xanthomonas albilineans*. *J. of Bacteriol.* 178: 4590-4596.
201. RUPE, J. C., E. E. GBUR, and D. M. MARX. 1991. Cultivar responses to sudden death syndrome of soybean. *Plant Dis.* 75: 47-50.
202. SAS Institute, I. SAS/STAT user's guide. ed. Cary, N.C., 1989.
203. SCHNEIDER, S., J. M. KRUFFER, D. ROESSLI, and L. EXCOFFIER. Arlequin ver 1.1. A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry laboratory. University of Geneva, Switzerland, 1997.
204. SHANER, G., and R. E. FINNEY. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67: 1051-1056.
205. SHANER, G., E. L. STROMBERG, G. H. LACY, K. R. BARKER, and T. P. PIRONE. 1992. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Ann. Rev. Phytopathol* 30: 47-66.
206. SHELDON, A. L. 1969. Equitability indices: dependence on the species count. *Ecology* 50: 466-467.
207. SICARD, D., Y. MICHALAKIS, M. DRON, and C. NEEMA. 1997. Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of diversity of its host, *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology* 87: 807-813.
208. SLATKIN, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of ecology and systematics* 16: 393-430.
209. SNEATH, P. H. A., and R. R. SOKAL. *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. San Francisco: W. H. Freeman, 1973.
210. SPATH, C. D. 1973. Plant domestication: the case of *Manihot esculenta*. *J. Steward Anthropol. Soc.* 5:
211. STARR, M. P. 1946. The nutrition of phytopathogenic bacteria. I. Minimal nutritive requirements of the genus *Xanthomonas*. *J. Bacteriol.* 51: 131-143.
212. STOLP, H., M. P. STARR, and N. L. BAIGENT. 1965. Problems in speciation of phytopathogenic Pseudomonads and Xanthomonads. *Annu. Rev. Phytopathol.* 3: 231-264.
213. SWARUP, S., Y. YANG, M. KINGSLEY, and D. GABRIEL. 1992. An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Mol. Plant. Microbe Interac.* 5: 204-213.
214. TAKATSU, A., S. FUKUDA, and S. PERRIN. Epidemiological aspects of bacterial blight of cassava. In *Brazilian: Diseases of Tropical Food Crops.*, Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgique, 1978.
215. TANG, J. L., J. X. FENG, Q. Q. LI, H. X. WEN, D. L. ZHOU, T. J. GREER WILSON, J. M. DOW, Q. S. MA, and M. J. DANIELS. 1996. Cloning and Characterization of the *pthC* Gene

- of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*: Involvement in Exopolysaccharide Production and Virulence to Rice. *Mol. Plant Microbe Interac.* 9: 664-666.
216. TANG, J. L., Y. N. LIU, C. E. BARBER, J. M. DOW, J. C. WOOTTON, and M. J. DANIELS. 1991. Genetic and molecular analysis of a cluster of *orpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol. Gen. Genet.* 226: 409-417.
217. TAYLOR, J. D., D. M. TEVERSON, and J. H. C. DAVIS. 1996. Sources of resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* races in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Pathol.* 45: 479-485.
218. TERRY, E. R., G. J. PERSLEY, and S. C. A. COOK. Cassava bacterial blight in Africa. London: Center for Overseas Pest Research, 1979.
219. TODD, T. C., and N. A. TISSERAT. 1990. Occurrence, spatial distribution, and pathogenicity of some phytoparasitic nematodes on creeping bentgrass putting greens in Kansas. *Plant Dis.* 74: 660-663.
220. VALES, M. 1987. La résistance durable: cas de la pyriculariose du riz I - Les qualités associées à la résistance durable. *L'agronomie Tropicale* 42: 103-111.
221. VAN DER PLANK, J. E. Disease Resistance in Plants. New York, 1968.
222. VAN DER PLANK, J. E. Plant Diseases: Epidemics and control. New York, 1963.
223. VAUTERIN, L., B. HOSTE, K. KERSTERS, and J. SWINGS. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International J. Syst. Bacteriol.* 45: 472-489.
224. VAUTERIN, L., B. HOSTE, P. YANG, A. ALVAREZ, K. KERSTERS, and J. SWINGS. Taxonomy of the genus *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, 1993.
225. VAUTERIN, L., J. SWINGS, and K. KERSTERS. 1991. Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of protein. *J. of Gen. Microbiol.* 137: 1677-1687.
226. VAVILOV, N. I. Geographical centers of our cultivated plants. *Int. Congr. Genet.*, 5th. ed., 1928.
227. VERA CRUZ, C. M., E. Y. ARDALES, D. Z. SKINNER, J. TALAG, R. J. NELSON, F. J. LOUWS, H. LEUNG, T. W. MEW, and J. E. LEACH. 1996. Measurement of Haplotypic variation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by rep-PCR and RFLP analyses. *Phytopathology* 86: 1-10.
228. VERDIER, V. Contribution à l'étude de la variabilité de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (Arthaud Berthet et Bondar) Starr agent causal de la bactériose vasculaire du manioc (*Manihot esculenta* Crantz). Th. Université de Paris Sud, 1988, pp 216.
229. VERDIER, V., B. BOHER, H. MARAITE, and J. P. GEIGER. 1994. Pathological and molecular characterization of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of cassava (*Manihot esculenta*). *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4478-4486.
230. VERDIER, V., G. CUNY, K. ASSIGBETE, J. P. GEIGER, and C. BOUCHER. Characterization of pathogenicity gene *pthB* in *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Edited by G. Stacey, B. Mullin and P. Gresshoff, University of Tennessee, Knoxville, TN, 1996.
231. VERDIER, V., P. DONGO, and B. BOHER. 1993. Assessment of genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2591-2601.

232. VERDIER, V., S. RESTREPO, G. MOSQUERA, M. C. DUQUE, A. GERSTL, and R. LABERRY. 1998. Genetic and pathogenic variation of *Xanthomonas axonopodis* sp. *manihotis* in Venezuela. *Plant Pathol.* 47: 601-608.
233. VERDIER, V. B., BOHER, and DANIEL, J.F. 1992. Cassava Bacterial Blight Research Report. 1992. ORSTOM, Montpellier pp.17.
234. VIEGAS, A. P. 1940. Mofos de afídeos e alirírodídeos. *Rev. Agric. Piracicaba* 15: 475-485.
235. VOIGT, K., S. SCHLEIR, and J. WOSTEMEYER. 1998. RAPD- based molecular probes for the blackleg fungus *Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam*): evidence for pathogenicity group-specific sequences in the fungal genomes. *J. Phytopathol.* 146: 567-576.
236. VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, T. VAN DE LEE, M. HORNES, A. FRIJTERS, J. POT, J. PELEMAN, M. KUIPER, and M. ZABEAU. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
237. WATVE, M., and R. M. GANGAL. 1996. Problems in measuring bacterial diversity and a possible solution. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4299-4301.
238. WEINER, R., S. LANGILLE, and E. QUINTERO. 1995. Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides. *J. Ind. Microbiol.* 15: 339-346.
239. WELSH, J., and M. MCCLELLAND. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213-7218.
240. WHITTAKER, R. H. 1972. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* 21: 213-251.
241. WHYTE, J. B. A. Breeding cassava for adaptation to environmental stress. Cassava breeding: a multidisciplinary review. ed., edited by C. H. Hershey, Proceedings workshop held in the Philippines, 1987, pp 147-176.
242. WILLIAMS, J. G. K., A. R. KUBELIK, K. J. LIVAK, J. A. RAFALSKI, and S. V. TINGEY. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
243. WILLIAMS, R. J., S. D. AGBOOLA, and R. W. SCHNEIDER. 1973. Bacterial wilt of cassava in Nigeria. *Plant Dis. Rep.* 57: 824-827.
244. WITSENBOER, H., J. VOGEL, and R. W. MICHELMORE. 1997. Identification, genetic localization, and allelic diversity of selectively amplified microsatellite polymorphic loci in lettuce and wild relatives (*Lactuca* spp.). *Genome* 40: 923-936.
245. WOLFE, M. S. 1985. The current status and prospects of multiline cultivars and variety mixtures for disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23: 251-273.
246. WOLFE, M. S., and J. M. MCDERMOTT. 1994. Population genetics of plant pathogen interactions: the example of the *Erysiphe graminis*-*Hordeum vulgare* pathosystem. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 89-113.
247. WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann Eugen* 1: 323-334.
248. WYDRA, K., A. FESSEHAIE, A. FANOU, R. SIKIROU, J. JANSE, V. VERDIER, and K. RUDOLPH. Variability of strains of *Xanthomonas campestris* sp. *manihotis* (XCM), incitant of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) bacterial blight, from different geographic origins in pathological, physiological, biochemical and serological characteristics. Proceedings of the 9th

International Congress of Plant Pathogenic Bacteria. Ed., Balasubramanian, D. Lalithakumari and A. Mahadevan, University of Madras, Madras, India. 1998, pp 317-323.

249. XIA, J. Q., J. C. CORRELL, F. N. LEE, M. A. MARCHETTI, and D. D. RHOADS. 1993. DNA fingerprinting to examine microgeographic variation in the *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*) population in two rice fields in Arkansas. *Phytopathology* 83: 1029-1035.

250. YANG, Y., and D. W. GABRIEL. 1995. Intragenic recombination of a single plant pathogen gene provides mechanism for the evolution of new host specificities. *J. Bacteriol.* 177: 4963-4968.

251. YAO, J. D. C., J. M. CONLY, and M. KRAJDEN. 1995. Molecular typing of *stentropholonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* by DNA macrorestriction analysis and random amplified polymorphic dna analysis. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2195-2198.

252. YAP, I., and R. J. NELSON. Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrogrammes. Manila, Philippines, 1996.

253. YASHITOLA, J., D. KRISHNAVENI, A. P. K. REDDY, and R. V. SONTI. 1997. Genetic diversity within the population of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in India. *Phytopathology* 87: 760-765.

254. YOUNG, J. M., D. S. JONES, and M. GILLINGS. 1996. Relationships between populations of *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* determined by restriction fragment analysis. *Plant Pathol.* 45: 350-357.

255. YOUNG, J. M., Y. TAKIKAWA, L. GARDAN, and D. E. STEAD. 1992. Concepts in bacterial taxonomy. *Ann. Rev. Phytopathol.* 30: 67-105.

256. ZAPATA, M. 1997. Identificación de razas de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* en hojas de *Phaseolus vulgaris*. *Agronomía Mesoamericana* 8: 44-52.

257. ZEIGLER, R. S., L. X. CUOC, R. P. SCOTT, M. A. BERNARDO, D. H. CHEN, B. VALENT, and R. J. NELSON. 1995. The relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. *Phytopathology* 85: 443-451.

7 ANNEXES

SOMMAIRE

Figure 1: Plant, racines tubérisées, graines et boutures de manioc.	1
Figure 2: Centres de diversité des espèces du genre <i>Manihot</i> .	2
Tableau 1: Production de manioc dans le monde en 1998	3
Tableau 2: Description des différentes zones édapho-climatiques (ECZ) de culture du manioc.	4
Figure 3: Représentation du schéma de sélection du manioc	5
Figure 4: Répartition de la bactériose vasculaire du manioc dans le monde.	6
Figure 5: Symptômes de la bactériose vasculaire du manioc observés au champ.	7
Figure 6: Cycle de la bactériose vasculaire du manioc.	8
Tableau 3: Nouvelle nomenclature de la taxonomie des <i>Xanthomonas</i>	9
Figure 7: Morphologie de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> , colonies de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> en boîte de Pétri.	10
Tableau 4: Définitions des composants du pouvoir pathogène proposées par différents auteurs.	11
Figure 8: Structure du gène de pathogénicité <i>pthB</i> de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	12
Figure 9: Techniques d'inoculation utilisées pour la caractérisation du pouvoir pathogène de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	13
Tableau 5: Principaux résultats publiés sur l'étude du pouvoir pathogène de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> .	14
Figure 10: Représentation schématique de la technique AFLP	16
Figure 11: Carte de Colombie indiquant les principales régions géographiques étudiées	17
Tableau 6: Description des échelles d'évaluation de la bactériose vasculaire du manioc utilisées en serre et au champ	18
Figure 12 A et B: Symptômes observés en serre après inoculation de tige. Lésions foliaires induites par différentes souches de <i>Xam</i> .	19
Figure 13: Symptômes observés au champ.	21
Tableau 7: Réactions de 17 variétés de manioc, 30 jours après l'inoculation de 5 souches de <i>X. a.</i> pv. <i>manihotis</i> .	24
Tableau 8: Analyse de variance des réponses de 17 variétés de manioc au cours du temps après l'inoculation de 5 souches <i>Xam</i> .	25

A



B



C



Figure 1: A: Plant de manioc âgé de 18 mois; B: Racines tubérisées de manioc après un an et demi de culture. C: Graines et boutures de manioc.

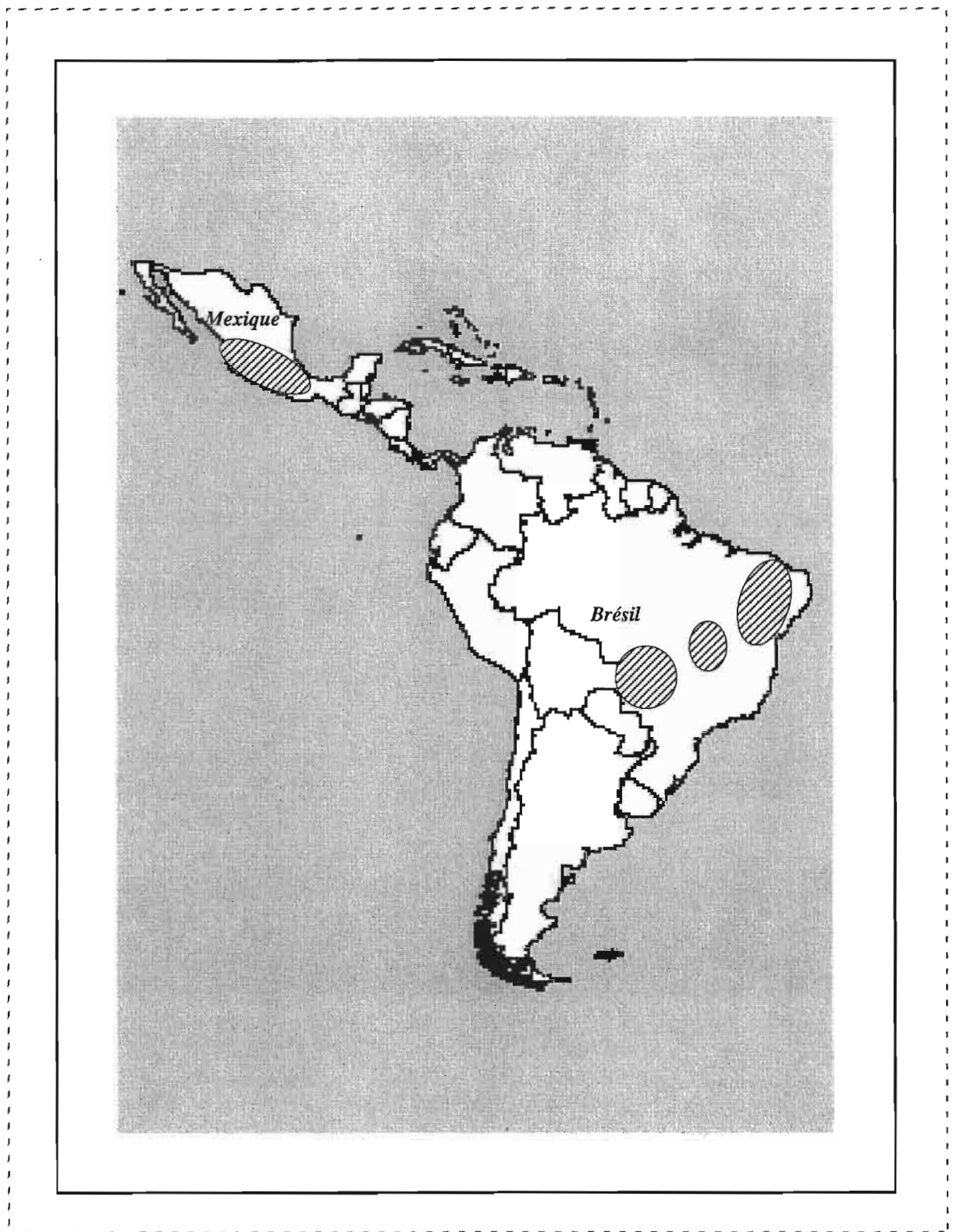


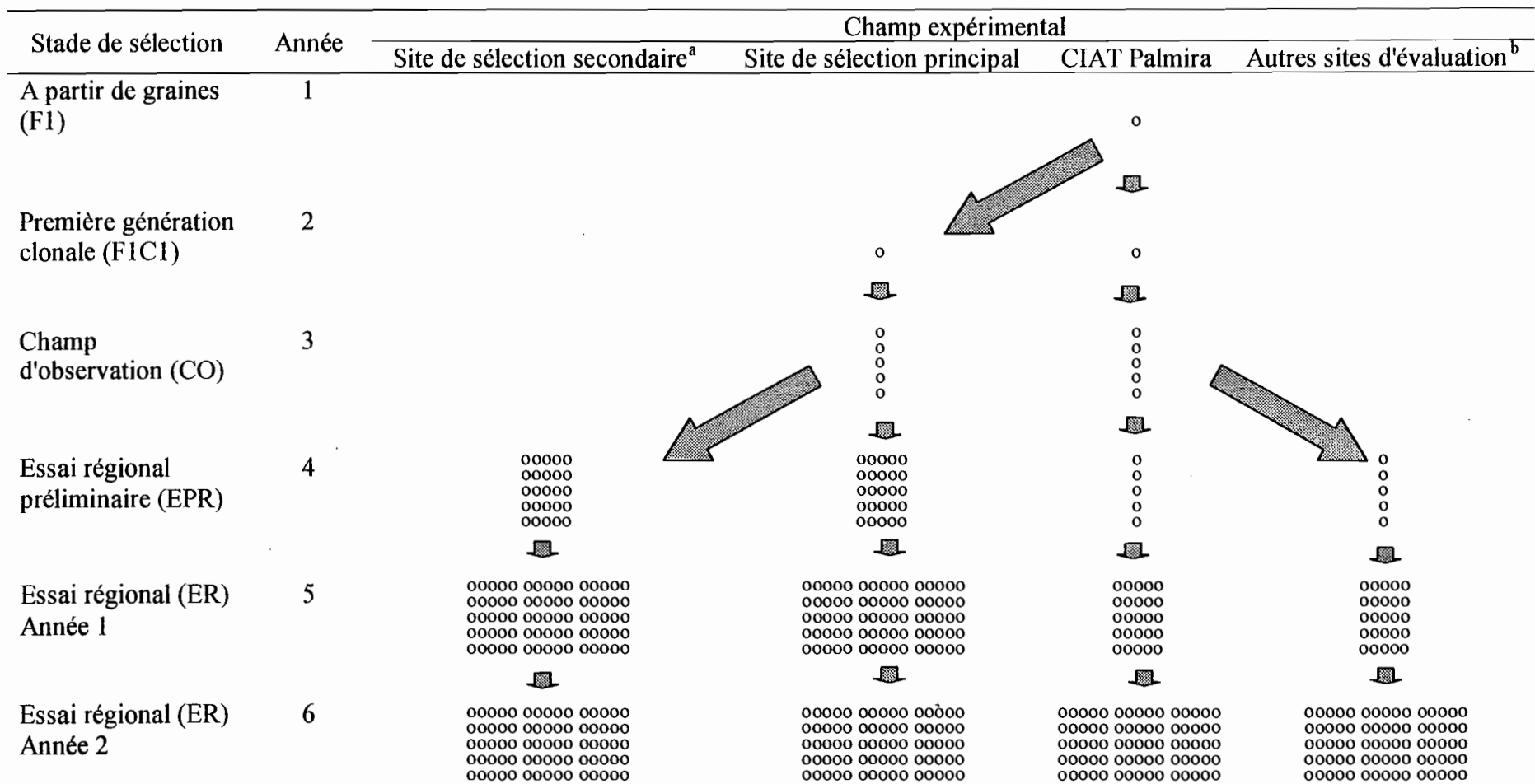
Figure 2: Centres de diversité des espèces du genre *Manihot* (d'après Nassar, (159)).

PAYS	Superficie (1000 ha)	Rendement (t/ha)	Production (1000 t)
AFRIQUE	10347	8.3	86073
Angola	576	5.5	3210
Mozambique	1015	5.5	5639
Nigéria	2697	11.2	30409
Tanzanie	693	8.9	6192
ASIE	3482	13.3	46445
Indonésie	1233	13.0	16052
Philippines	240	8.3	2000
Thaïlande	1200	13.2	15958
Vietnam	238	8.3	1983
AMERIQUE DU SUD ET CARAIBE	2388	11.8	28292
Brésil	1607	12.6	20394
Colombie	184	9.9	1844
Cuba	65	3.8	250
Haïti	62	3.9	247
Paraguay	236	13.9	3300
Pérou	70	10.9	755

Tableau 1: Production de manioc dans le monde en 1998 (Source: FAO, (70)). Les principaux pays producteurs sont indiqués.

Zone édaphoclimatique	Caractéristiques	Principales contraintes de la culture
1	Tropiques de basse altitude, longue saison sèche, basses précipitations annuelles, températures élevées	Sécheresse, cochenille, acariens, termites, bactériose, pourriture racinaire
2	Savanes à sols acides, longues saisons sèches, humidité relative basse pendant la saison sèche	Faible fertilité des sols, sécheresse, bactériose, superélongation, anthracnose, acariens, cochenille
3	Tropiques bas sans saison sèche, précipitations et humidité relative élevées	Faible fertilité des sols
4	Tropiques d'altitude moyenne (800-1500m) avec des températures et des saisons sèches modérées	Acariens, bactériose, mycoplasmes, anthracnose, pourritures racinaires
5	Tropiques de haute altitude, température moyenne entre 17 et 20°C	Températures basses, anthracnose, bactériose
6	Zone tempérées, hivers froids et journées de durée variable	Bactériose, superélongation, anthracnose, températures basses en hiver
7	Zones arides	Sécheresse

Tableau 2: Description des différentes zones édapho-climatiques (ECZ) de culture du manioc.



^a Même ECZ que celle du site de sélection principal

^b ECZ différente à celle du site de sélection principal, l'évaluation continue seulement si les caractéristiques agronomiques sont satisfaisantes

Figure 3: Représentation du schéma de sélection du manioc (o = plant de manioc), (Source, programme d'amélioration, CIAT).

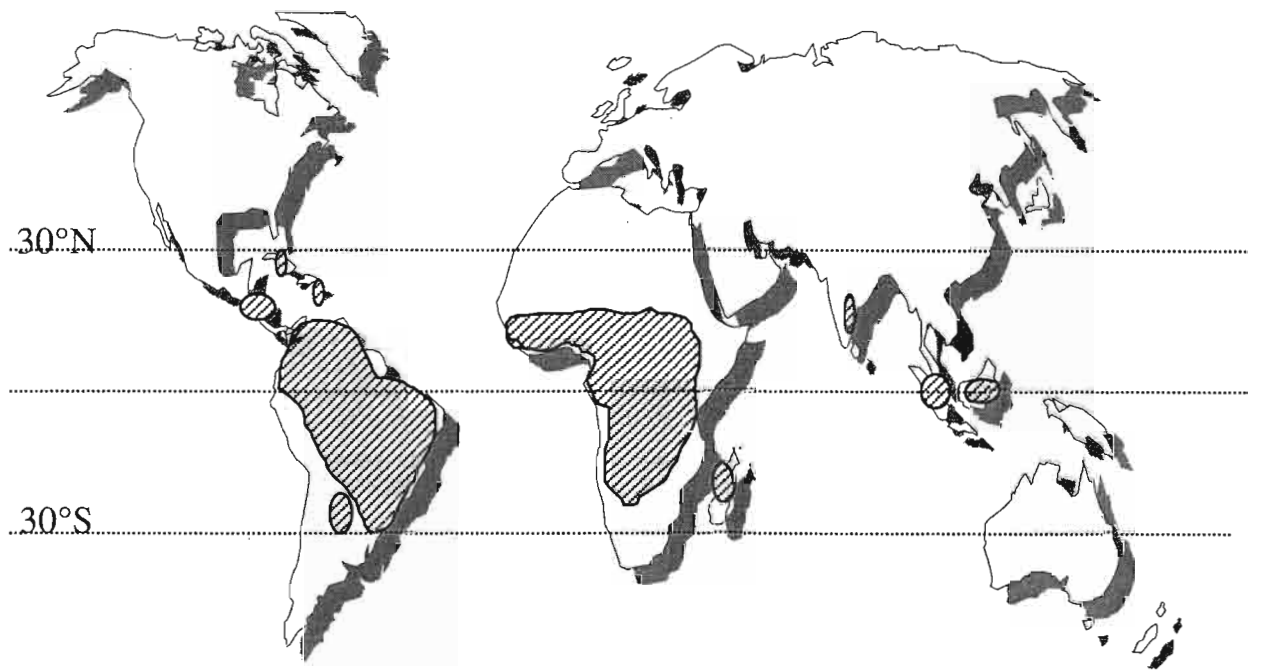


Figure 4: Répartition de la bactériose vasculaire du manioc dans le monde.

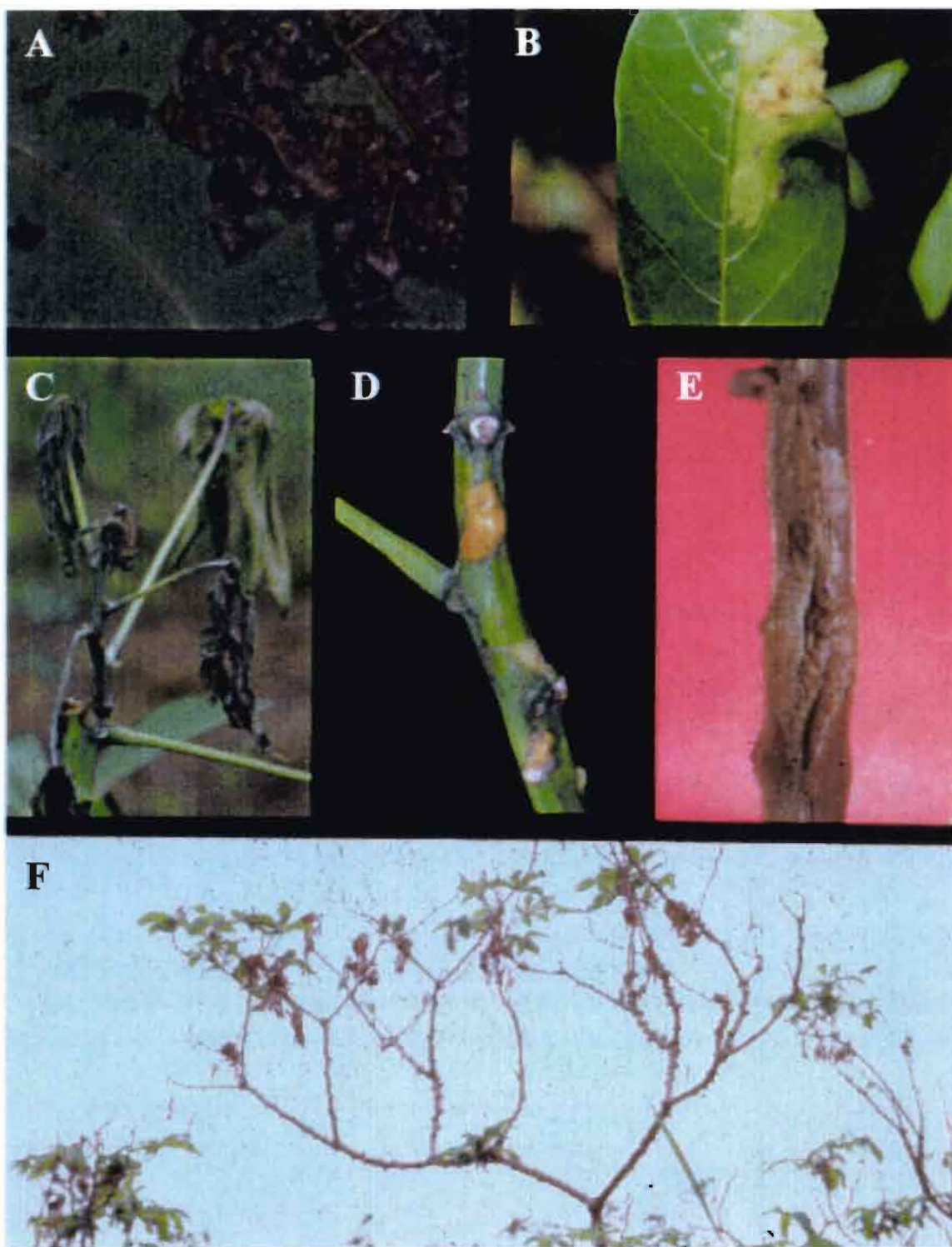


Figure 5: Symptômes de la bactériose vasculaire du manioc observés au champ. **A:**Taches anguleuses d'aspect gras visibles à la face inférieure d'un lobe foliaire. **B:**Brûlure foliaire; **C:** Flétrissement de feuilles provoqué par la contamination vasculaire. **D:** Lésions sur tige aoûtée avec exsudation d'un mélange de latex et de bactéries. **E:** Chancre sur tige. **F:** Dessèchement des sommités.

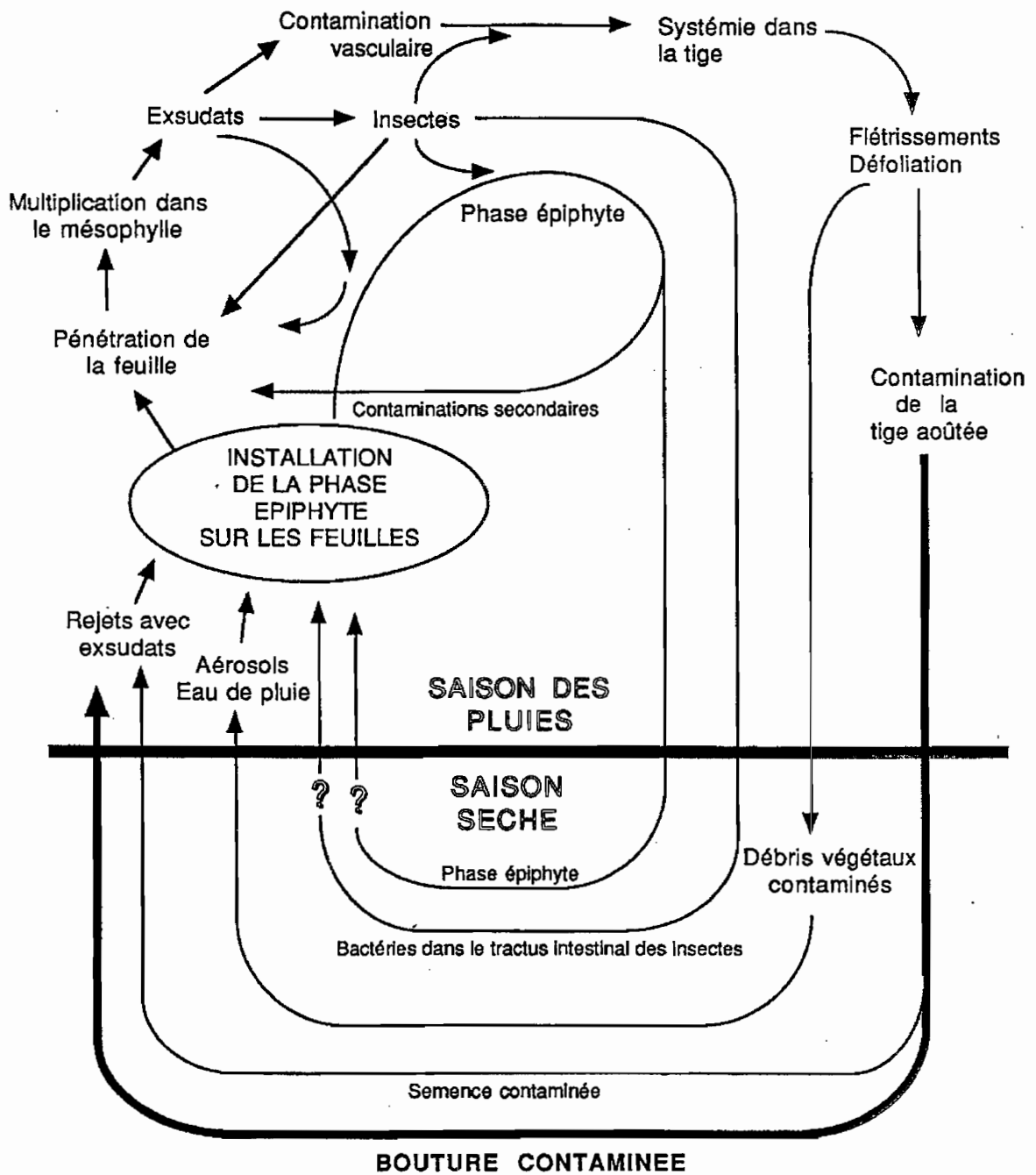


Figure 6: Cycle de la bactériose vasculaire du manioc.

Groupe	Nom proposé	Groupe	Nom proposé
1	<i>X. fragariae</i>	9	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>ricini</i>
2	<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i> <i>X. hortorum</i> pv. <i>hederae</i> <i>X. hortorum</i> pv. <i>vitians</i>		<i>X. axonopodis</i> pv. <i>sesbaniae</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>tamarindi</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vignaeradiatae</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vignicola</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vitians</i>
3	<i>X. populi</i>	10	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>
4	<i>X. arboricola</i> pv. <i>corylina</i> <i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> <i>X. arboricola</i> pv. <i>poinsettiicola</i> <i>X. arboricola</i> pv. <i>populi</i> <i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	11	<i>X. vasicola</i> pv. <i>holcicola</i> <i>X. vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i>
5	<i>X. cassavae</i>	12	<i>X. pisi</i>
6	<i>X. codiae</i>	13	<i>X. melonis</i>
7	<i>X. bromi</i>	14	<i>X. vesicatoria</i>
8	<i>X. cucurbitae</i>	15	<i>X. campestris</i> pv. <i>aberrans</i> <i>X. campestris</i> pv. <i>armoraciae</i> <i>X. campestris</i> pv. <i>barbareae</i> <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> <i>X. campestris</i> pv. <i>incanae</i> <i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i>
9	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>alfalfae</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>bauhiniae</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>cajani</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>cassavae</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>cassiae</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citrumelo</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>clitoriae</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>coracanae</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>cyamopsidis</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>desmodii</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>desmodiigangetici</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>desmodiilaxiflori</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>desmodiitundifolii</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>erythrinae</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>lespedezae</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>patelii</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phyllanthi</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>poinsettiicola</i> <i>X. axonopodis</i> pv. <i>rhynchosiae</i>	16	<i>X. translucens</i> pv. <i>arrhenatheri</i> <i>X. translucens</i> pv. <i>cerealis</i> <i>X. translucens</i> pv. <i>graminis</i> <i>X. translucens</i> pv. <i>hordei</i> <i>X. translucens</i> pv. <i>phlei</i> <i>X. translucens</i> pv. <i>phleipratensis</i> <i>X. translucens</i> pv. <i>poae</i> <i>X. translucens</i> pv. <i>secalis</i> <i>X. translucens</i> pv. <i>translucens</i> <i>X. translucens</i> pv. <i>undulosa</i>
		17	<i>X. hyacinthi</i>
		18	<i>X. theicola</i>
		19	<i>X. sacchari</i>
		20	<i>X. albilineans</i>
		21	<i>S. maltophilia</i>

Tableau 3: Nouvelle nomenclature de la taxonomie des *Xanthomonas* (groupes d'homologie et noms) proposée Vauterinet *al.* (223).

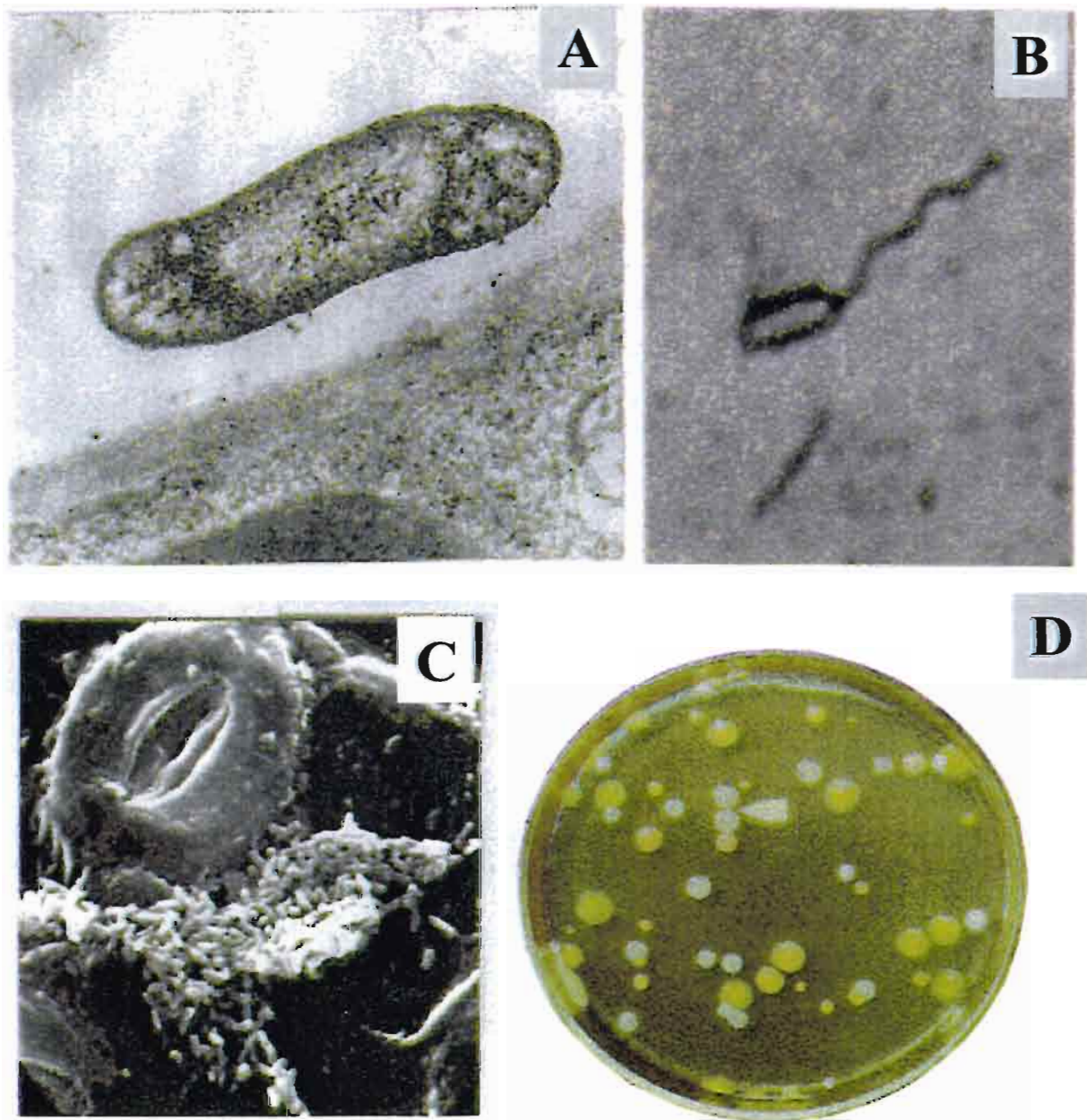


Figure 7: **A:** Morphologie de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* en microscopie électronique. Bactérie dans un espace intercellulaire de la feuille de manioc (4.7 cm = 1 μ m) (source B. Boher)

B: Morphologie de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* en microscopie optique, mise en évidence du flagelle par la coloration de Rhodes (1 cm = 1 μ m) (source B.Boher)

C: Observations en microscopie électronique à balayage de *Xam* sur feuilles de vitroplant de manioc. Bactéries à proximité de l'ostiole.(source V.Verdier)

D: Colonies bactériennes isolées à partir d'eau de lavage des feuilles de manioc sur milieu LPGA après 24h de culture à 30°C en boîte de Petri. La fleche blanche indique deux colonies de *Xam* (source B.Boher)

Concepts	Définitions	Auteurs
Pouvoir pathogène	Aptitude à parasiter une espèce	Nelson (165)
Pouvoir pathogène vertical	Aptitude à parasiter une variété. Interaction souche X cultivar est démontrée	Robinson (195)
Pouvoir pathogène horizontal	Aptitude à parasiter une espèce. Interaction souche X cultivar n'est pas démontrée	Robinson (195)
Virulence	Aptitude à parasiter une variété. Interaction souche X cultivar est démontrée	Van der Plank (222); Parlevliet (174)
	Aptitude à parasiter une variété	Kiyosawa (114); Bos et Parlevliet (22)
	Aptitude à agresser plus ou moins une espèce	Nelson (165); Shaner <i>et al.</i> (205)
	Aptitude à parasiter une variété. La résistance de type oligogénique	Fleming et Person (76)
	Aptitude à parasiter et à se reproduire sur une variété	Andrison (6)
Agressivité	Aptitude à agresser plus ou moins une variété	Kiyosawa (114); Bos et Parlevliet (174)
	Aptitude à parasiter une espèce. Interaction souche X cultivar n'est pas démontrée	Van der Plank (222) Parlevliet (22)
	Aptitude à parasiter une variété. Résistance de type polygénique	Fleming et Person (76)
	Quantité de maladie induite pour une interaction hôte – parasite donnée	Andrison (6)
Fitness du parasite	Aptitude à agresser plus ou moins une variété	Shaner <i>et al.</i> (205)

Tableau 4: Définitions des composantes du pouvoir pathogène proposées par différents auteurs.

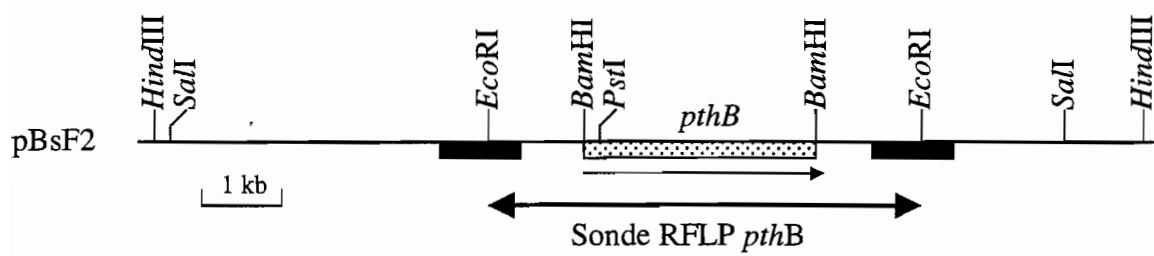


Figure 8: Structure du gène de pathogénicité *pthB* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* utilisé comme sonde dans les études RFLP (source V. Verdier)

A



B



Figure 9: A: Inoculation par piqûre de tige; **B:** Inoculation par blessure du limbe. La goutte d'inoculum est déposée sur la blessure.

Tableau 5: Principaux résultats publiés sur l'étude du pouvoir pathogène de *X. axonopodis* pv. *manihotis*

Auteur	Souches	Cultivars	Technique d'inoculation	Résultats
CIAT, 1976 (34)	52 souches d'Amérique, d'Asie et d'Afrique	Cultivars MCOL 113, MCOL 1438, MCOL 647	Blessure des feuilles avec des ciseaux trempés dans une culture bactérienne (10^8 CFU/ml)	4 groupes d'agressivité selon les réactions induites sur les 3 cultivars
CIAT, 1977 (38)	Huit souches représentatives de différents groupes de virulence	29 cultivars de manioc	Blessure des feuilles avec des ciseaux trempés dans une culture bactérienne (10^8 CFU/ml)	Différences d'agressivité entre souches mais pas d'interaction cultivar X souche
CIAT, 1978 (37)	50 souches d'Amérique, d'Asie et d'Afrique	9 cultivars de manioc	Blessure de feuille avec des ciseaux trempés dans une culture bactérienne (10^8 CFU/ml)	Différences d'agressivité entre souches.
Takatsu <i>et al.</i> , (214)	5 souches isolées de différentes régions du Brésil	7 cultivars commerciaux du Brésil	Blessure de feuille avec des ciseaux trempés dans une culture bactérienne (10^8 CFU/ml)	Différences d'agressivité entre les souches. Les études concernant l'identification des races doivent être approfondies
Elango and Lozano, (66)	66 souches d'Amérique, d'Asie et d'Afrique	9 cultivars de manioc	Coupure de feuille avec des ciseaux trempés dans une culture bactérienne (10^8 CFU/ml)	5 classes d'agressivité selon les symptômes observés sur tous les cultivars. Les interactions cultivar X souche ne sont pas significatives.
Maraite <i>et al.</i> , (147)	31 souches d'Amérique, d'Asie et d'Afrique	13 cultivars de manioc	Perforation du foliole avec des aiguilles trempées dans une culture bactérienne (10^9 CFU/ml) Piqûre de tige avec une aiguille trempée dans une culture bactérienne.	Les différences d'agressivité entre souches ne sont pas évidentes. Différences d'agressivité entre souches. Les résultats suggèrent une interaction souche X cultivar

Table 5 (suite)

Alves and Takatsu, (5)	2 souches d'Amérique, 'Asie et d'Afrique	Cultivars Mamão et Sutinga	Piqûre de tige avec un cure-dent trempé dans une culture bactérienne.	6 classes d'agressivité selon les symptômes observés.
Grousseau <i>et al.</i> , (86)	54 souches du Congo et quelques souches références	Cultivars M'Pembé et Koussakanandi	Perforation du foliole avec un emporte-pièce trempé dans une culture bactérienne Piqûre de tige avec une aiguille trempée dans une culture bactérienne.	Une analyse de variance montre des différences d'agressivité entre souches Différences d'agressivité entre souches.
Verdier <i>et al.</i> , (229)	19 souches d'Amérique, d'Asie et d'Afrique	Cultivar Fetonegbodgi	Perforation du foliole avec un emporte-pièce et dépôt de 10 µl d'une culture bactérienne (10 ⁸ CFU/ml)	6 classes d'agressivité significativement différentes.
Wydra <i>et al.</i> , (248)	49 souches de différents pays d'Afrique	Cultivar Agric	Piqûre de tige avec un cure dent trempé dans une colonie bactérienne	Différences dans la vitesse de formation des symptômes entre souches
Fessehaie, (75)	47 souches de différents pays d'Afrique	Cultivar Agric	Piqûre de tige avec un cure dent trempé dans une colonie bactérienne	6 classes d'agressivité selon la vitesse de formation des symptômes

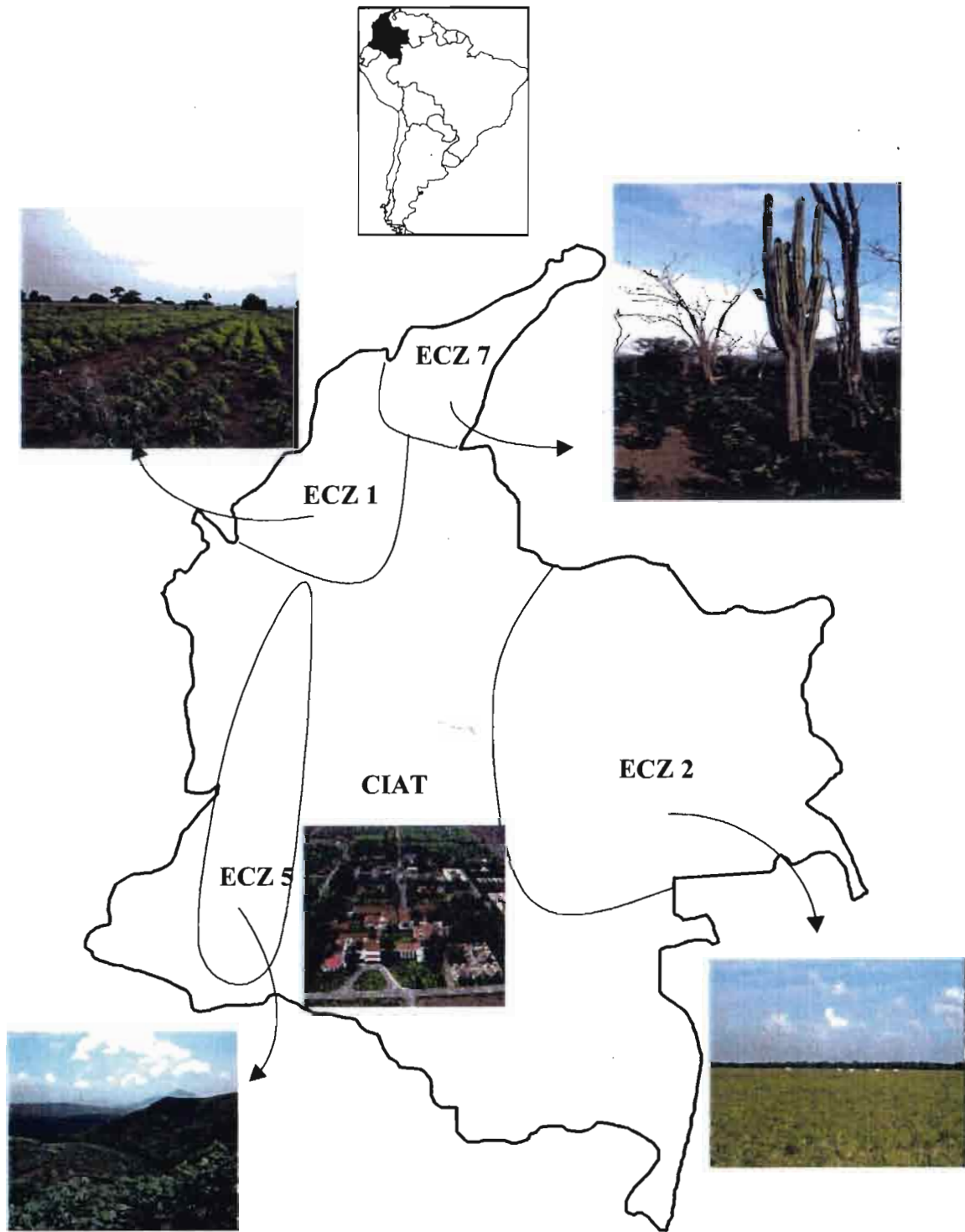


Figure 11: Carte de Colombie indiquant les principales régions géographiques étudiées: Les zones édaphoclimatiques (ECZ) de culture du manioc en Colombie sont: ECZ1 = tropiques sub-humides; ECZ2 = savanes à sols acides; ECZ5 = tropiques de haute altitude; ECZ7 = zones arides. Le CIAT est également indiqué.

Echelle utilisée pour les notations en serre

Note 0	Aucune réaction visible
Note 1	Zone nécrotique brun foncé autour du point de piqure ne dépassant pas 5mm en diamètre ou zone translucide autour du point d'inoculation
Note 2	Apparition d'exsudats sur la tige dont la taille est mesurée en cm.
Note 3	Flétrissement d'une ou deux feuilles.
Note 4	Flétrissement de plus de deux feuilles
Note 5	Déshydratation de la sommité

Echelle utilisée pour les notations en champ

Note 1	Aucun symptôme
Note 2	Des taches anguleuses seulement.
Note 3	Des taches anguleuses, des flétrissements de feuilles, des brûlures foliaires, exsudat sur pétioles et tiges.
Note 4	Des flétrissements importants.
Note 5	Des flétrissements importants, une défoliation complète avec dessèchement des sommités et arrêt végétatif.

Tableau 6: Description de l'échelle d'évaluation de la bactériose vasculaire du manioc utilisée en serre et au champ (voir aussi figures 13-et 14).

Figure 12A: Symptômes observés en serre après inoculation de tige. Note 0: Aucun symptôme, 1: zone nécrotique au point d'inoculation, 2: Apparition d'exsudats sur la tige (taille en cm), 3 - 4: Flétrissement des feuilles, 5: Flétrissement total de la plante

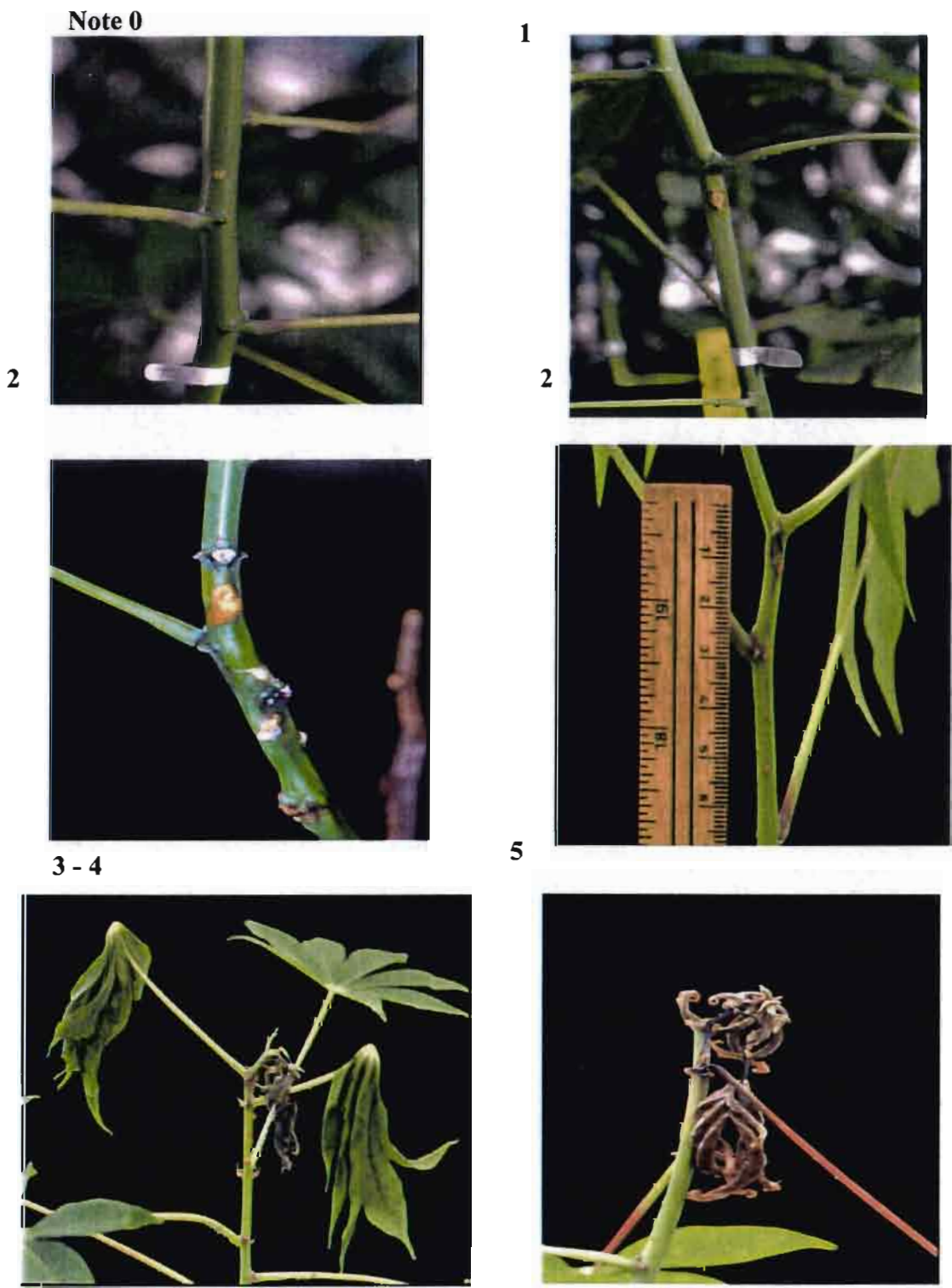
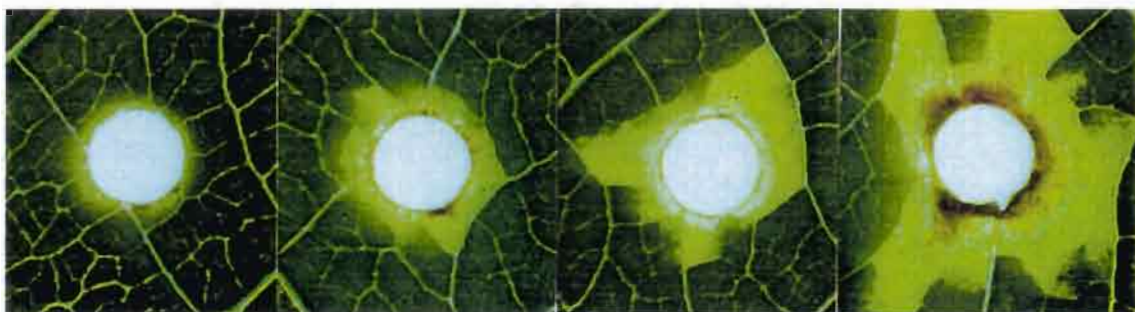


Figure 12B: Lésions foliaires induites par différentes souches de *Xam* après inoculation par blessure foliaire



Note 1



Note 2



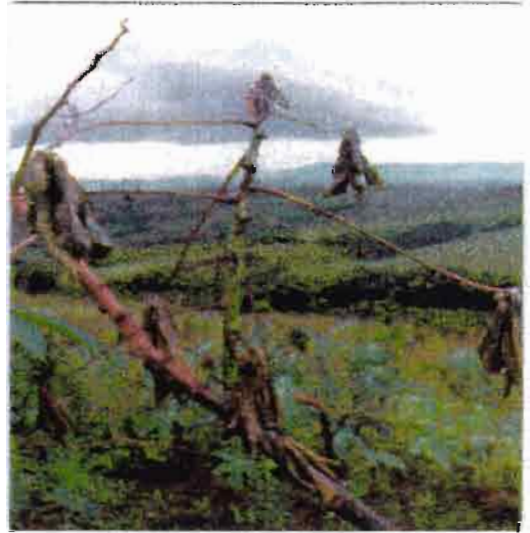
Note 3



Note 3 (suite)



Note 4



Note 5



Figure 13: Symptômes de la bactériose vasculaire observés au champ

Note 1: Plant sain

Note 2: Taches anguleuses d'aspect gras visibles à la face inférieure d'un lobe foliaire, brûlure foliaire

Note 3: Exsudats, flétrissement des feuilles

Note 4: Des flétrissements importants

Note 5: Défoliation complète avec dessèchement des sommités et arrêt végétatif.

Variété	ECZ d'adaptation	Souches					Moyenne
		CIO 300	CIO 307	CIO 378	CIO 387	CIO 390	
CM 2177-2	2	5 (S ^a)	5 (S)	5 (S)	5 (S)	5 (S)	5
MCOL 22	1	4 (S)	3 (R)	5 (S)	4.7 (S)	5 (S)	4.3
MNGA 9	4	3.5 (S)	5 (S)	4.3 (S)	5 (S)	5 (S)	4.6
CM 5286-3	2	5 (S)	5 (S)	5 (S)	5 (S)	3.7 (S)	4.6
MNGA-2	1	4.7 (S)	4.7 (S)	5 (S)	4 (S)	3.5 (S)	4.4
MBRA 685	1	4.3 (S)	4.3 (S)	3.5 (S)	4.3 (S)	3.9 (S)	4.1
CM 523-7	2	5 (S)	5 (S)	5 (S)	5 (S)	5 (S)	5
MBRA 12	1	5 (S)	5 (S)	5 (S)	5 (S)	5 (S)	5
MVEN 25	1	4.7 (S)	4.8 (S)	4 (S)	5 (S)	4.5 (S)	4.6
CG 402-11	5	5 (S)	5 (S)	5 (S)	5 (S)	5 (S)	5
CM 6438-14	2	4.6 (S)	5 (S)	3 (S)	5 (S)	3.4 (S)	4.2
MBRA 902	2	4 (S)	3.7 (S)	5 (S)	5 (S)	5 (S)	4.6
MBRA 881	6	4 (S)	4.5 (S)	5 (S)	5 (S)	4.2 (S)	4.6
MCOL 1505	1	5 (S)	5 (S)	5 (S)	5 (S)	5 (S)	5
MBRA 886	6	4.8 (S)	5 (S)	5 (S)	5 (S)	4 (S)	4.8
MCOL 2261	5	4 (S)	4 (S)	5 (S)	3.7 (S)	5 (S)	4.3
MCOL 1522	5	5 (S)	4.8 (S)	4.4 (S)	5 (S)	4.4 (S)	4.7
Moyenne		4.6	4.6	4.7	4.8	4.5	

Tableau 7: Réactions de 17 variétés de manioc, 30 jours après l'inoculation de 5 souches de *X. a. pv. manihotis* correspondant aux 2 groupes UPGMA caractérisés par AFLP.

Source de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	<i>F</i>	<i>p</i>
Souche	4	1.72	1.16	0.33
Cultivar	16	9.00	1.51	0.1
Cultivar X souche	63	27.97	1.19	0.18

Tableau 8: Analyse de variance des réponses de 17 variétés de manioc au cours du temps après l'inoculation de 5 souches *Xam* correspondant aux 2 groupes UPGMA caractérisés par AFLP.

LISTE DES PUBLICATIONS

LISTE DE PUBLICATIONS

- Restrepo S. and Verdier V. 1997. Geographical differentiation of the population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. Appl. Env. Microbiol. 63:4427-4434.
- Restrepo S., Verdier V., Mosquera G., Gerstl A., Laberry R., Valle T. and Alvarez E. 1997. Cassava bacterial blight in South America: pathogenic and genetic characterization of the causal agent and its application to screening methods. African Journal of Root and Tuber Crops, Vol. 2, p. 61-63
- Restrepo S., Duque, M.C., Verdier V. and Tohme J. 1999. AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. Microbiology 145: 107-114
- Restrepo S., Sanchez G., Duque M.C. and Verdier V. (1999). Assessing genetic variability among Brazilian strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* through RFLP and AFLP analyses. Canadian Journal of Microbiology. In press.
- Verdier V., Restrepo S., Boher B., Nicole M., Geiger J.P., Alvarez E. and Bonierbale M. 1997. Cassava bacterial blight: recent achievements in understanding the disease. African Journal of Root and Tuber Crops, Vol 2, p. 64-68
- Verdier V., Restrepo S., Mosquera G., Duque M.C., Gerstl A. and Laberry R. 1998. The *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* population in Venezuela: its genetic and pathogenic variation. Plant Pathology, 47:601-608
- Verdier V. and Restrepo S. 1997. Répartition géographique de la bactériose vasculaire du manioc en Colombie et variabilité du pathogène. Les cahiers de la recherche développement, 44: 16-27.
- Sanchez G., Restrepo S., Duque M.C., Fregene M., Bonierbale M. and Verdier V. 1999. Characterization of the genetic base of resistance to cassava bacterial blight with amplified fragment length polymorphism. Genome, 42: 163-172.

SOUJIS

- Restrepo S., Sanchez G., Duque M.C. and Verdier V. (1999). Characterization of pathotypes among strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. Plant Disease
- Restrepo, S., Duque, M. C., and Verdier, V. (1999). Resistance spectrum of selected *Manihot esculenta* genotypes under Field Conditions. Field Crops Research.
- Restrepo, S., Vélez, C. M., and Verdier, V. 1999. Measuring the Genetic Diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* Within Different Fields in Colombia. Phytopathology.

COMPTE-RENDUS DE CONGRÈS ET AFFICHES.

Restrepo S., C. M. Vélez, V. Verdier. 1999. Role of the host in causing differentiation among *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* strains. 9th International congress of Molecular Plant-Microbe Interactions. Amsterdam. July 25-30.

Restrepo S., M.C. Duque, T. Losada Valle and V. Verdier. 1998. Genetic differentiation of Brazilian strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* by RFLP, AFLP and virulence analysis. In Proceedings of the CBN IV, Bahia, 2-7 Nov.

Restrepo S., Tohme J. and Verdier V. 1998. Assessment of the AFLP technique for the genetic study of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland, 9-16 August 1998

Restrepo S., Velez C., Verdier V. 1998. Measurement of the genetic diversity in *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* within different fields in Colombia. 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland, 9-16 August 1998.

Restrepo S. and Verdier V. 1998. DNA Polymorphism and virulence variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) in Colombia. In: Proceedings of the 9th International Congress of Plant Pathogenic Bacteria. R. Balasubramanian, D. Lalithakumari and A. Mahadevan (ed.), University of Madras, Madras, India, in press.

Restrepo S., Verdier V. and Tohme J. 1998. La technique AFLP: application à l'étude de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. In: Proceedings troisièmes rencontres de phytobactériologie, 11-15 Janvier, Aussois.

Restrepo S., V. Verdier, E. Alvarez. 1996. Variation de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* en Colombie et écologie. Proc. 2emes Rencontres Phytobacteriology, Aussois, 5-9 Février, 131p.

Restrepo, S., Verdier, V., Alvarez, E. 1996. Polymorphisme de l'ADN et variabilité du pouvoir pathogène de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* en Amérique du Sud. *Poster presented in: IV ème Congrès de la Société Française de Phytopathologie, Nice, 19-22 Novembre 96.*