

# Identification de l'agent responsable de la maladie des taches noires de la mangue (*Mangifera indicae*)

**J.F. DANIEL, L. GARDAN, J. LUISETTI et J.P. PRUNIER\***

IDENTIFICATION DE L'AGENT RESPONSABLE DE LA MALADIE DES TACHES NOIRES DE LA MANGUE (*MANGIFERA INDICAE*)

J.F. DANIEL, L. GARDAN, J. LUISETTI et J.P. PRUNIER

*Fruits*, oct. 1975, vol. 30, n°10, p. 625-630.

RESUMÉ - Une bactérie isolée de lésions sur mangues en provenance de l'île de la Réunion a été identifiée à *Pseudomonas mangifera indicae* PATEL et al, responsable de la maladie des taches noires (black spot).

Des mangues présentant des lésions superficielles ont été envoyées pour analyse bactériologique, au laboratoire de Phytobactériologie de l'INRA à Angers par la Station de la Réunion de l'IFAC.

## SYMPTÔMES

Les fruits sont recouverts de nombreuses petites taches noires ayant l'aspect de petites « pustules » dues à l'excoriation locale de l'épiderme. La confluence de ces petites lésions entraîne la formation de craquelures plus ou moins importantes à la surface du fruit. Chacune de ces taches noires se trouve au centre d'une petite dépression qui s'enfonce plus ou moins profondément dans le fruit. Si on enlève l'épiderme à ce niveau on constate alors que les tissus ont un aspect « huileux » assez caractéristique de lésions d'origine bactérienne.

J.F. DANIEL, Chercheur ORSTOM stagiaire à la Station de Phytobactériologie d'Angers. Adresse à partir de janvier 1976 : Laboratoire de Phytopathologie, Centre ORSTOM d'Adiopodoumé (République de Côte d'Ivoire).  
L. GARDAN, J. LUISETTI et J.P. PRUNIER, Station de Pathologie végétale et Phytobactériologie, CRA Angers.

## ISOLEMENTS

Des isolements effectués sur de nombreuses lésions révèlent la présence constante d'une flore bactérienne dense et homogène. Sept souches ont été prélevées en vue d'une identification et d'une comparaison avec la souche de référence de *Pseudomonas mangifera indicae* fournie par la National Collection of Plant Pathogenic Bacteria Harpenden, Grande Bretagne (N.C.P.P.B. n°490).

## CARACTÉRISATION DES ISOLATS

### Méthodes.

#### Caractères culturaux.

La morphologie des colonies est décrite après 24 heures d'incubation à 26° C sur les milieux suivants : L.P.G.A. (extrait de levure 0,5 p. cent, bactopectone 0,5 p. cent, glucose 0,5 p. cent, agar 2 p. cent), milieu B de KING, milieu saccharose (8).

#### Colorations.

Les bactéries sont examinées pour la coloration de Gram.

On observe les flagelles après coloration par la technique

Collection de Référence

8650 P.Z.A.C.R

29 AOUT 1977

de RHODES (11). Les inclusions lipidiques sont révélées au noir cérol B, à partir d'une culture sur milieu minéral de STANIER (12) avec du poly-B-hydroxybutyrate comme seule source de carbone.

#### Activité biochimique.

Le mode d'utilisation du glucose est déterminé selon la méthode de HUGH et LEIFSON (5).

La présence d'une oxydase, d'une catalase, la réduction des nitrates, la production d'indole à partir du tryptophane, la dégradation de l'urée (milieu de Ferguson et milieu de Christensen), la production d'H<sub>2</sub>S, sont recherchées selon les méthodes décrites dans le memento technique de microbiologie (7).

La recherche de Tween esterase, de gélatinase, d'amylase, de l'hydrolyse de la caésine, est réalisée sur milieu L.P.G.A. complétement respectivement avec du Tween 80, de la gélatine, de l'amidon soluble et du lait. L'activité gélatinase est révélée par la méthode de Frazier.

La tolérance vis-à-vis du chlorure de sodium est étudiée sur milieu L.P.G.A. additionné de NaCl à la concentration de 5 p. cent.

L'activité cellulolytique a été recherchée selon la technique décrite par OSHIRA (9).

Le test L.O.P.A.T. (production de levane, oxydase, hydrolyse de la pectine, activité arginine dihydrolase, hypersensibilité sur tabac) est effectué selon les techniques décrites par LELLIOTT et al (8).

#### Utilisation des composés carbonés et azotés.

La croissance des cultures bactériennes est examinée en fonction de la source de carbone ajoutée à un milieu de base. Comme milieu de base nous avons utilisé le milieu minéral de STANIER et al (12) en boîte de Pétri et le milieu de HAYWARD (3) en tube. Dans les deux cas, les composés carbonés utilisés sont stérilisés par filtration sur membrane.

La lecture est faite sept jours après l'inoculation.

Pour l'étude de la croissance avec les composés servant à la fois de source de carbone et d'azote, nous avons utilisé uniquement le milieu minéral de STANIER.

#### Antibiogramme.

Il est réalisé selon la méthode des disques (Institut Pasteur, Paris).

#### Pouvoir pathogène.

Le pouvoir pathogène est testé par inoculation artificielle de mangues vertes soit au niveau d'une blessure de l'épiderme, soit au niveau de l'insertion du pédoncule sur le fruit.

Les fruits sont ensuite placés à 25-30°C sous une enceinte plastique.

#### Résultats.

Dans tous les tests, les sept souches isolées ont un comportement homogène et presque totalement identique à celui de la souche de référence.

Après 24 heures d'incubation sur milieu L.P.G.A. et sur milieu B de KING, les colonies sont blanches à crèmes, d'aspect brillant, bombées et de contour régulier. Sur milieu B de KING on n'observe pas de production de pigment fluorescent. Sur ces milieux, les cultures âgées deviennent muqueuses.

Sur milieu hypersaccharosé, les cultures présentent l'aspect bombé et opaque caractéristique des bactéries dites «levane +».

La bactérie se présente sous forme d'un petit batonnet Gram - ; elle est mobile par un flagelle polaire. Son métabolisme est oxydatif, elle possède une catalase mais pas d'oxydase. Aucune des souches y compris la souche de référence n'accumule le poly-B-hydroxybutyrate.

Tous ces caractères nous amènent à classer la bactérie dans le groupe des *Pseudomonadaceae*. Malheureusement la

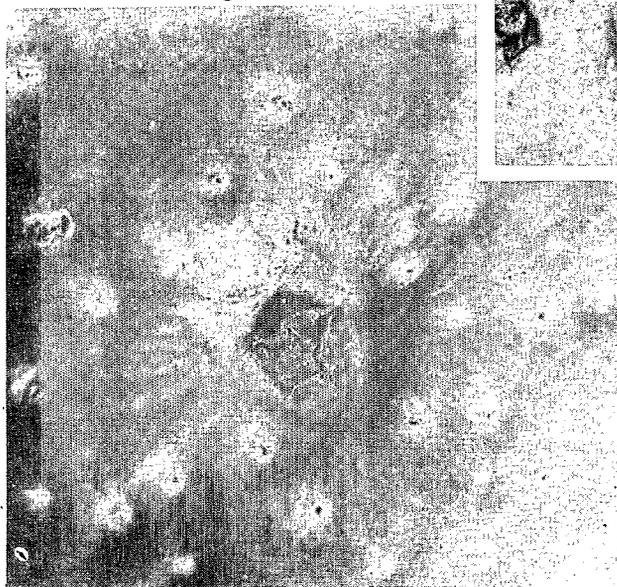
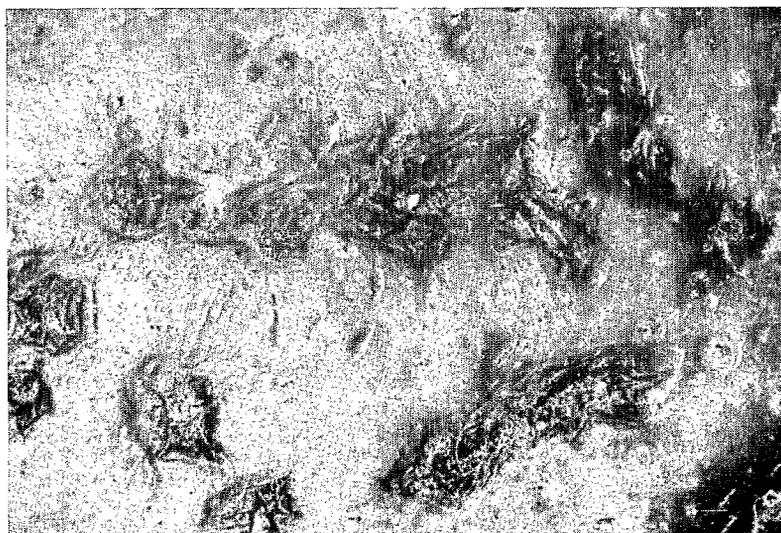
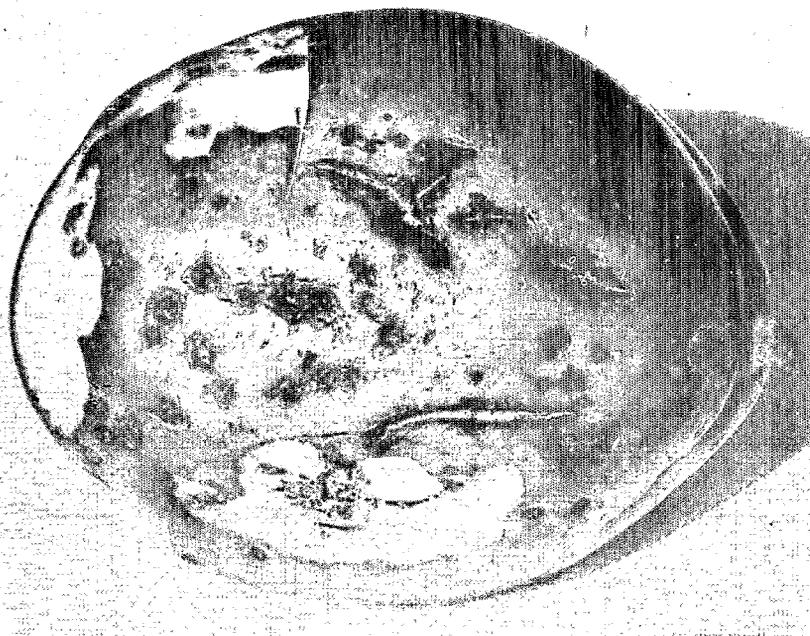
TABLEAU 1 - Test L.O.P.A.T. et autres caractères biochimiques des isolats de mangues et de la souche de référence NCPPB 490

| Caractères                             | Souches | Isolats | 490 |
|--|---------|---------|-----|
| Levane                                 |         | +       | +   |
| Oxydase                                |         | -       | -   |
| Pectine                                |         | -       | -   |
| Arginine dihydrolase                   |         | -       | -   |
| Tabac (H.R.)                           |         | +       | +   |
| Hugh et Leifson                        |         | ox      | ox  |
| Pigment fluorescent                    |         | -       | -   |
| Esculine                               |         | +       | +   |
| Polypectate pH5                        |         | -       | -   |
| Polypectate pH7                        |         | +       | -   |
| Polypectate pH8                        |         | -       | -   |
| Amylase                                |         | +       | +   |
| Catalase                               |         | +       | +   |
| Caseinolyse                            |         | +       | +   |
| Cellulase                              |         | +       | +   |
| Gélatinase                             |         | +       | +   |
| Uréase                                 |         | -       | -   |
| Réduction des nitrates                 |         | -       | -   |
| Production d'H <sub>2</sub> S          |         | -       | -   |
| Indole                                 |         | -       | -   |
| NaCl 5 p. cent                         |         | -       | -   |
| Accumulation de poly-B-hydroxybutyrate |         | -       | -   |

+ réaction positive

- réaction négative

ox oxydatif



**Photo 1.** Aspect général d'une mangue atteinte de la maladie des taches noires. Noter que les nécroses s'enfoncent dans la chair du fruit (visible dans les zones où l'épiderme a été enlevé). Remarquer aussi la formation de craquelures.

**Photo 2.** Plan rapproché d'un ensemble de taches. Noter l'excoriation de l'épiderme à leur niveau.

**Photo 3.** Détail d'une «pustule». Noter sa position au centre d'une dépression.

TABLEAU 2 - Utilisation de diverses sources de carbone, et de différentes sources de carbone et d'azote, par nos isolats en comparaison avec la souche de référence NCPPB 490

| Caractères                      | Isolats        |                | 490            |                |
|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                                 | milieu Stanier | milieu Hayward | milieu Stanier | milieu Hayward |
| <b>A. SOURCE DE C.</b>          |                |                |                |                |
| Adonitol                        | +              | +              | +              | -              |
| L-Arabinose                     | -              | +              | -              | +              |
| Arbutine                        | +              | +              | +              | +              |
| Amygdaline                      | +              | ±              | +              | -              |
| Cellobiose                      | +              | +              | +              | +              |
| Dulcitol                        | +              | +              | +              | +              |
| Erythritol                      | ±              | +              | ±              | +              |
| Galactose                       | +              | +              | +              | +              |
| Glucose                         | +              | +              | +              | +              |
| Glycérol                        | +              | ±              | +              | ±              |
| Inuline                         | ±              | +              | +              | +              |
| DL-Lactate                      | ±              | ±              | ±              | -              |
| Lactose                         | +              | +              | +              | +              |
| Lévulose                        | +              | +              | +              | +              |
| Maltose                         | +              | +              | +              | +              |
| Mannitol                        | +              | +              | +              | +              |
| Mannose                         | +              | +              | +              | +              |
| Mélibiose                       | +              | +              | +              | +              |
| Raffinose                       | +              | +              | +              | +              |
| Rhamnose                        | -              | +              | -              | +              |
| Saccharose                      | +              | +              | +              | +              |
| Salicine                        | +              | ±              | +              | -              |
| Sorbitol                        | +              | +              | +              | +              |
| Succinate                       | +              | +              | +              | +              |
| D-Tartrate                      | -              | -              | -              | -              |
| L-Tartrate                      | -              | -              | -              | -              |
| Xylose                          | +              | +              | +              | +              |
| <b>B. SOURCE DE C. ET DE N.</b> |                |                |                |                |
|                                 | milieu Stanier |                | milieu Stanier |                |
| L-Alanine                       | +              |                | +              |                |
| DL-Arginine                     | -              |                | -              |                |
| L-Asparagine                    | -              |                | -              |                |
| Bétaïne                         | -              |                | -              |                |
| L-Phénylalanine                 | ±              |                | ±              |                |
| L-Thréonine                     | -              |                | -              |                |

+ réaction positive  
 - réaction négative  
 ± réaction faiblement positive

clé de détermination du Bergey's Manual ne permet pas de ranger ces souches parmi les espèces y figurant. Cependant nos souches ont un comportement identique à la souche de référence (tableaux 1 et 2) et les résultats concordent avec ceux décrits dans la littérature par STEYN et VILJOEN (13), excepté pour l'uréase et l'utilisation du polypectate. En effet toutes les souches sont uréase négative ; la souche

de référence ainsi qu'une des souches isolées ne présentent pas d'activité pectinolytique sur milieu de HILDEBRAND et ceci aux trois pH d'utilisation.

En ce qui concerne les antibiogrammes (tableau 3) nous notons que toutes les souches ont un comportement vis-à-vis des antibiotiques, sauf les souches 490 et G 21-1 qui, seules, sont sensibles à l'ampicilline.

TABLEAU 3 - Détermination de la sensibilité aux agents antibactériens, selon la méthode des disques pour nos sept souches isolées et la souche de référence.

| Souches | Antibiotiques |     |     |    |      |       |     |     |     |     |     |     |
|---------|---------------|-----|-----|----|------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|         | Amp           | Str | Cmp | Gt | Kana | Rif   | Suf | Col | Oxt | Min | Nal | Ery |
| G 21-1  | ± S           | S   | S   | S  | S    | S     | R   | S   | S   | S   | S   | S   |
|         |               | <1  | <1  | <1 | <1   | <0,15 |     |     | <1  | <1  | <1  |     |
| G 21-3  | R             | S   | S   | S  | S    | S     | R   | S   | S   | S   | S   | S   |
|         |               | <1  | <1  | <1 | <1   | <0,15 |     |     | <1  | <1  | <1  |     |
| G 21-4  | R             | S   | S   | S  | S    | S     | R   | S   | S   | S   | S   | S   |
|         |               | <1  | <1  | <1 | <1   | <0,15 |     |     | <1  | <1  | <1  |     |
| G 21-5  | R             | S   | S   | S  | S    | S     | R   | S   | S   | S   | S   | S   |
|         |               | <1  | <2  | <1 | <1   | <0,15 |     |     | <1  | <1  | <1  |     |
| G 21-6  | R             | S   | S   | S  | S    | S     | R   | S   | S   | S   | S   | S   |
|         |               | <1  | <2  | <1 | <1   | <0,15 |     |     | <1  | <1  | <1  |     |
| G 21-7  | R             | S   | S   | S  | S    | S     | R   | S   | S   | S   | S   | S   |
|         |               | <1  | <1  | <1 | <1   | <0,15 |     |     | <1  | <1  | <1  |     |
| 490     | ± S           | S   | S   | S  | S    | S     | R   | S   | S   | S   | S   | S   |
|         |               | <1  | <1  | <1 | <1   | <0,15 |     |     | <1  | <1  | <1  |     |

S : sensible R : résistant

le chiffre indique une estimation de la concentration minimale inhibitrice en mcg/ml.

Amp : Ampicilline

Gt : Gentamycine

Col : Colistine

Str : Streptomycine

Kana : Kanamycine

Oxt : Oxytetracycline

Cmp : Chloramphenicol

Rif : Rifampicine

Nal : Ac. nalidixique

Min : Minocycline

Suf : Sulfamides forts

Ery : Erythromycine

L'inoculation artificielle des souches isolées nous a permis de reproduire partiellement les symptômes obtenus dans les conditions naturelles. Sur tous les fruits inoculés, on voit apparaître au niveau de l'épiderme de petites nécroses en dépression et de couleur noire semblables à celles que l'on observe sur des fruits malades. Cependant, comme nous avons travaillé sur des fruits en survie, qui arrivent donc très vite à maturité, nous n'avons pas pu obtenir l'expression complète des symptômes. A partir des lésions ainsi obtenues, nous avons pu réisoler sans aucune difficulté les souches ayant servi à l'inoculation.

### CONCLUSION

Le comportement homogène de toutes les souches, la quasi-identité avec la souche de référence et la concordance

des résultats avec ceux décrits dans la littérature, nous permettent d'identifier la bactérie isolée à *Pseudomonas mangifera indicae*.

La reproduction partielle des symptômes confirme en outre la responsabilité de ces souches dans la maladie des taches noires de la mangue.

Par ses caractères *Pseudomonas mangifera indicae* doit être exclu du groupe des *Pseudomonas* fluorescents (7<sup>ème</sup> éd. du Bergey's Manual) et n'entre pas dans les autres groupes définis dans la 8<sup>ème</sup> édition du Bergey's Manual. Comme STEYN et VILJOEN nous pensons que sa position au sein des *Pseudomonas* doit être redéfinie.

Ce germe précédemment isolé en Indes, en Afrique du sud, au Pakistan, se trouve maintenant présent à l'île de la Réunion. Nous ne connaissons cependant pas sa distribution et son incidence sur la production.

### BIBLIOGRAPHIE

1. COWAN (S.T.), MURRAY (R.G.E.) et STANIER (R.Y.). 1974. Bergey's Manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, Md.
2. DOIDGE (E.M.). 1915. A bacterial disease of the Mango *Bacillus mangiferae* n. sp. *Ann. Biol.*, 2, p. 1-45.
3. HAYWARD (A.C.). 1960. A method for characterizing *Pseudomonas solanacearum*. *Nature*, 186, p. 405-406.
4. HILDEBRAND (D.C.). 1971. Pectate and pectins gels for differentiation of *Pseudomonas* sp. and other bacterial plant pathogen. *Phytopath.*, 61, p. 1430-1436.
5. HUGH (R.) et LEIFSON (E.). 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram - bacteria. *Bacteriol.*, 66, p. 24-26.

6. KING (E.O.), WARD (M.K.) and RANEY (D.E.). 1954.  
Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein.  
*J. lab. clin. med.*, 44, p. 301-307.
7. LARPENT (J.P.) et LARPENT-GOURGAUD (M.). 1975.  
Memento technique de Microbiologie.  
P.S.I. Genève.
8. LELLIOT (R.A.), BILLING (E.) and HAYWARD (A.C.). 1966.  
A determinative scheme for the fluorescent pathogenic pseudomonads.  
*J. Appl. Bact.*, 29, p. 470-489.
9. OSHIRA (L.S.), HINE (R.B.) and GOTO (S.). 1964.  
The identification of *Pseudomonas adropogonis* as a cause of a firm rot disease in the Terete Vanda orchid in Hawaii.  
*Plant Dis. Rep.*, 48, p. 736-740.
10. PATEL (M.K.), MONIZ (L.) and KULKARNI (Y.S.). 1948.  
A new bacterial disease of *Mangifera indica*.  
*L. Curr. Sci.*, 6, p. 189-190.
11. RHODES (M.E.). 1958.  
The cytology of *Pseudomonas* spp. as revealed by a silver plating staining method.  
*J. Gen. Microbiol.*, 18, p. 639-648.
12. STANIER (R.Y.), PALLERONI (N.J.) and DOUDOROFF (M.). 1966.  
The aerobic pseudomonads : a taxonomic study.  
*J. Gen. Microbiol.*, 43, p. 159-271.
13. STEYN (P.L.), VILJOEN (N.M.) and KOTZE (J.M.). 1974.  
The causal organism of bacterial black spot of mangoes.  
*Phytopath.*, 64, p. 1400-1404.
14. VILJOEN (N.M.), STEYN (P.H.) and KOTZE (J.M.). 1972.  
Bakteriese swartvlek van mango.  
*Phytophylactica*, 4, p. 93-94.

