

## DETERMINATION D'UNE SOUCHE DE *XANTHOMONAS ALBILINEANS* (ASHBY) DOWSON ISOLEE DE HAUTE-VOLTA

P. BAUDIN\*, Michèle CHATENET\*

**RESUME** — La bactérie responsable de l'Echaudement des feuilles, *Xanthomonas albilineans* (ASHBY) DOWSON a été isolée de canne à sucre malade, var. B 73436, provenant de Haute-Volta et déterminée par des tests morphologiques, physiologiques, biochimiques et biologiques. Par test d'immunofluorescence indirecte, la souche Haute-Volta paraît être un sérotype assez spécifique présentant toutefois des communautés antigéniques avec d'autres souches hétérologues venant de Réunion, Guadeloupe et Kenya.

**Mots-clé** : *Xanthomonas albilineans*, canne à sucre, génotype, Haute-Volta.

Avec le développement de l'industrie sucrière en Haute-Volta et l'augmentation du potentiel variétal, de nouvelles affections apparaissent, plus particuliè-

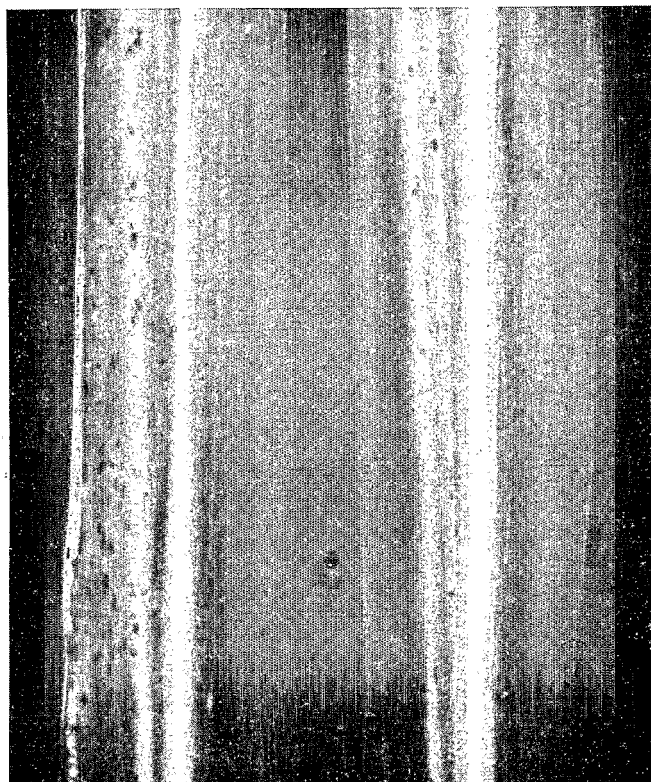


Figure 1 : Symptômes caractéristiques, type «pencil line», de l'Echaudement de la canne à sucre.

rement au moment de la multiplication à l'échelle industrielle d'une nouvelle variété. Ainsi dans des parcelles d'essais de fin de sélection, les feuilles de la variété B 73436 ont montré de fines lignes blanches, continues le long d'une nervure, faisant penser à un symptôme de la phase chronique de l'Echaudement des feuilles ou «Leaf scald» (fig. 1). Nous rapportons ci-dessous l'identification de la bactérie responsable, que nous avons pu comparer à trois autres souches de *Xanthomonas albilineans*, agent de l'Echaudement.

### MATERIEL ET METHODES

Les variétés de canne à sucre B 54142 et de maïs Atos ont été utilisées pour les inoculations. Trois souches bactériennes de référence ont servi de témoin pour toutes les expériences :

- la souche Paulain a été isolée à la Guadeloupe et est conservée dans la Collection Nationale de Bactéries Pathogènes (INRA-Angers),
- une souche du Kenya isolée au laboratoire à partir de feuilles de la variété Co 467. La présence de la bactérie au Kenya a été signalée par RAMOS & SHAVDIA (1979),
- une souche de la Réunion isolée au laboratoire à partir de la variété H 328560, envoyée par le CERF-Réunion. La présence de la bactérie à la Réunion a été signalée par BOURIQUET (1953).

L'isolement de la bactérie, souche Haute-Volta, a été pratiqué selon la méthode de G.J. PERSLEY (1972),

\* BAUDIN (P.), CHATENET Michèle. Division de Défense des Cultures, Laboratoire Central Pathologie-végétal IRAT/GERDAT, BP 5035, 34032 MONTPELLIER CEDEX.

dans laquelle un fragment de feuille comprenant une très fine strie blanche (symptôme «pencil line») est préalablement stérilisé dans l'eau de Javel à 10 % pendant une minute, puis rincé deux fois dans l'eau stérile. On le dilacère ensuite aseptiquement dans quelques gouttes d'eau stérile et on laisse macérer quatre heures à 28°. Puis on prélève avec une anse de platine un peu du liquide obtenu que l'on étale par stries parallèles sur une boîte de pétri contenant du milieu de Wilbrink (Saccharose 1 %, Peptone 0,5 %,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05 %,  $\text{Mg SO}_4$  0,025 %,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0,005 %, Agar 2 %). En cours de repiquage la bactérie peut être cultivée sur milieu LPGA (Extrait de levure 0,05 %, Bactopeptone 0,5 %, Glucose 1 %, Gélose 2 %, pH 7,2).

Pour la transmission mécanique, un fragment de la culture bactérienne est prélevé à l'aide du fil à semer puis dilué dans 1 ml d'eau stérile et agité au Vortex pendant une minute. On obtient une suspension d'environ  $10^{11}$  bactéries par ml. Trente plants de maïs, var. ATOS, ont été inoculés au stade 3-4 feuilles, par injection à la seringue à la base de la tige avec la suspension bactérienne. Trente plants ont été inoculés avec la souche Paulain comme témoin positif. Trente plants inoculés avec de l'eau stérile donnent un témoin négatif. Les plants sont gardés en serre à 25°C.

L'observation des flagelles a été faite par la coloration de RHODES (1958), le type respiratoire a été déterminé par le test de HUGH & LEIFSON (1953), la mise en évidence d'oxydase par le test de KOVACS (1956). Pour étudier leur utilisation par les souches bactériennes, les sucres ont été ajoutés à la concentration de 5 % au milieu liquide aéré de HAYWARD ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0,1 %,  $\text{KCl}$  0,02 %,  $\text{MgSO}_4$  7H<sub>2</sub>O 0,02 %, Bactopeptone 0,1 % et Bleu de Bromothymol 0,003 % à pH 7).

Les sérums ont été préparés en injectant dans la veine marginale de l'oreille du lapin des suspensions de bactéries, ajustées à  $10^9$  ml, en solution saline. 0,5 ml, 1,5 ml, 3 ml, 4 ml et 5 ml ont été injectés respectivement les 1<sup>er</sup>, 3<sup>ème</sup>, 7<sup>ème</sup>, 11<sup>ème</sup> et 18<sup>ème</sup> jours au lapin qui est sacrifié, dix jours après la dernière injection, par prélèvement du sang à l'oreille, sous vide. Le sang est laissé pendant trois heures à la température du laboratoire, puis centrifugé à 5 000 g, 20 minutes, afin d'obtenir le sérum. Celui-ci est ensuite réparti en flacons stériles par doses de 1 ml, congelé à - 20° ou mélangé à parties égales avec du glycérol, avant conservation à - 20°.

Les tests de détection sérologique sont appliqués en suivant la méthode indirecte d'immunofluorescence décrite par NAIRN (1969). Une goutte de suspension bactérienne très diluée est déposée dans un cercle d'une lame pour immunofluorescence. On laisse sécher puis on fixe à l'alcool à 95° (5 minutes). L'immunsérum anti - *Xanthomonas albilineans*, dilué convenablement, est déposé sur le cercle et est laissé en contact 30 minutes. Après deux lavages de 5 minutes avec un tampon phosphate 0,01 M pH 7,2 physiologique, une grosse goutte de globulines fluorescentes de mouton anti Ig de lapin (Institut Pasteur), diluées à 1 %, est déposée

sur le cercle et laissée en contact 30 minutes. Après deux lavages au tampon physiologique et essuyage, on dépose une petite goutte de glycérine tamponnée avant de poser une lamelle. La préparation est observée au microscope photonique en lumière U.V.

## RESULTATS

### Isolement et caractérisation de la bactérie

Les colonies jaune pâle, translucides apparaissent sept jours après ensemencement sur le milieu de Wilbrink. Après repiquage sur LPGA on peut observer la croissance après cinq jours. Différents tests biochimiques ont été réalisés avec la bactérie originaire de Haute-Volta ainsi qu'avec deux autres souches de référence de provenance différente (Kenya, Guadeloupe). Les résultats sont donnés tableau I. Ils montrent que la souche Haute-Volta possède les mêmes propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques que les souches de référence.

### Transmission artificielle

Le premier symptôme sur maïs s'est manifesté dix jours après inoculation sous forme d'une fine ligne blanche, de part et d'autre de la piqûre, sur la feuille inoculée. Ultérieurement sur les nouvelles feuilles formées, on observe de fines lignes blanches continues, caractéristique de *Xanthomonas albilineans*. Les plants inoculés avec la souche Guadeloupe ont donné des symptômes identiques. La bactérie a été réisolée à partir de ces maïs malades.

Les témoins «eau stérile» ne présentaient aucun de ces symptômes.

Sur canne à sucre, var. B 54142, on observe, quinze jours après inoculation, des stries blanches sur les feuilles du fuseau foliaire inoculé, entre la blessure et la tige. Puis les symptômes disparaissent avec les feuilles infectées et réapparaissent sur les feuilles néoformées, 45 à 60 jours après.

### Sérologie

Deux immunsérums ont été utilisés pour les tests en immunofluorescence indirecte :

- un immunsérum anti-*Xanthomonas albilineans*, souche Réunion,
- un immunsérum anti-*Xanthomonas albilineans*, souche Haute-Volta.

La souche Haute-Volta et les trois souches bactériennes de référence ont été testées (fig. 2). Les résultats sont donnés tableau II).



Figure 2 : Marquage de *Xanthomonas albilineans* (ASHBY) DOWSON, souche Haute-Volta, en immunofluorescence indirecte : sérum homologue, 1/800, globulines fluorescentes de mouton, anti Ig de lapin (Institut Pasteur) 1/100.

Tableau I  
PROPRIETES MORPHOLOGIQUES, PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES  
DE LA SOUCHE HAUTE-VOLTA, COMPAREE A CELLE DE DEUX SOUCHES  
DE *XANTHOMONAS ALBILINEANS* (ASHBY) DOWSON. Résultats après quinze jours.

	Haute-Volta	Kenya	Guadeloupe (souche Paulain)
Aspect des colonies .....	jaune	jaune	jaune
Mobilité eau peptonée .....	+	+	+
Coloration de GRAM .....	-	-	-
Flagelles (coloration de RHODES) .....	un polaire	un polaire	un polaire
Type respiratoire (test de HUGH-LEIFSON)	aérobie	aérobie	aérobie
Oxydase (test de KOVACS) .....	-	-	-
Réduction des nitrates en nitrites .....	-	-	-
Sucres utilisés :			
- l- arabinose .....	+	+	+
- mannose .....	+	+	+
- glucose .....	+	+	+
- galactose .....	+	+	+
- cellobiose .....	+	+	+
- tréhalose .....	+	-	-
	(avec alcalinisation)		
- hydrolyse de l'esculine .....	-	+	-
Gélatine .....	-	-	-
Tolérance au NaCl 1 % .....	pousse	pousse faiblement	pousse
Tolérance au NaCl 5 % .....	-	-	-

Glucides : (+) croissance et acidification

Gélatine : (+) liquéfaction

Tableau II  
DILUTION LIMITE DE DEUX IMMUNSERUMS ANTI-*XANTHOMONAS ALBILINEANS*,  
SOUCHE HAUTE-VOLTA ET SOUCHE REUNION, PERMETTANT DE MARQUER QUATRE SOUCHES  
DE *XANTHOMONAS ALBILINEANS* EN IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

Ac \ Ag	Réunion	Haute-Volta	Kenya	Guadeloupe
Réunion	1 20480	1 160	1 160	1 80
Haute-Volta	1 20	1 10240	1 320	1 80

Les deux immunosérums ont un titre supérieur à 1/10000 contre les bactéries homologues. Par contre les sérums marquent les bactéries hétérologues qu'à faible dilution. Les communautés antigéniques entre les souches bactériennes sont faibles.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Par ses caractères cultureux, morphologiques, physiologiques, les réactions provoquées par son inoculation, le germe isolé de la canne à sucre, var. B 73436 provenant de Haute-Volta, peut être identifié à *Xanthomonas albilineans* (ASHBY) DOWSON. Par contre, l'étude comparée des propriétés sérologiques de diverses souches de *Xanthomonas albilineans* montre que, bien qu'un sérum préparé à partir de la souche Haute-Volta a un titre élevé pour la souche bactérienne homologue, il a peu de compatibilité avec les autres souches. Il en est de même avec la souche Réunion. Il paraît donc que des sérotypes peuvent être mis en évidence parmi les souches de *Xanthomonas albilineans*.

La région de Banfora en Haute-Volta doit donc être considérée comme contaminée par l'échaudement des feuilles, des symptômes de stries blanches, stade chronique de la maladie, ayant été observés à Béréga-dougou, Nyangoloko et Diarabakoko sur B 73436. Il n'est pas possible d'estimer l'importance de la maladie d'après les symptômes. En effet, LEOVILLE & COLENO (1976) ont montré en utilisant des tests sérologiques par immuno fluorescence que de nombreuses plantes peuvent être infectées sans montrer de symptômes au cours de la phase chronique de la maladie, alors que le taux de contamination peut être très élevé lors d'une phase aiguë due à des conditions défavorables pour la plante, comme la sécheresse.

La multiplication de la variété B 73436 a été arrêtée à la SO.SU.HV., les parcelles plantées doivent être supprimées. En vue d'une éventuelle remultiplication, de

nouvelles boutures garanties saines seront produites en quarantaine sous contrôle de tests par immunofluorescence et grâce à une thérapie adaptée (STEINDL, 1971). Les variétés en grande culture dans la région de Banfora sont connues comme étant soit résistantes, soit tolérantes, ce qui d'ailleurs rend difficile la recherche d'un foyer de la maladie.

## Remerciements

Monsieur RIDE, INRA-Angers, a accueilli Madame CHATENET dans son laboratoire où elle a pu réaliser les tests morphologiques, biochimiques et physiologiques grâce à ses conseils. Nous le remercions bien vivement.

## Références bibliographiques

- BOURIQUET (G.) (1953) — Les principales maladies de la canne à sucre dans les territoires et départements français d'Outre-Mer. Agron. Trop. 8, 4, 346-353.
- HAYWARD (A.C.) et WATERSTON (J.M.) (1964) — *Xanthomonas albilineans*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria n° 18.
- HUGH (R.) et LEIFSON (E.) (1953) — The taxonomic significance of fermentative versus oxydative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. J. of bacteriology 66, 24.
- KOVACS (N.) (1956) — Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by oxydase reaction. Nature : 178, 703.
- LEOVILLE (F.) et COLENO (A.) (1976) — Détection de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, agent de l'échaudure de la canne à sucre dans des boutures contaminées. Ann. Phytopathol. 8 : 233-236.
- NAIRN (E.C.) (1969) — Fluorescent protein tracing : Livingstone Edinburgh and London.
- PERSLEY (G.J.) (1972) — Isolating methods for the causal agent of Leaf scald disease. Sugarcane Pathologist's Newsletter 8, 24.
- RAMOS et SHAVDIA (1979) — Bacterial disease in Annual Report of the Scientific Research Division 1975. Ministry of Agriculture Kenya, p. 47.
- RHODES (M.E.) (1958) — The cytology of *Pseudomonas sp.* as revealed by a silver platine method. J. of General Microbiology : 18, 639-648.