

ETUDE DE LA GOMMOSE BACTERIENNE  
DE LA CANNE A SUCRE A MADAGASCAR

M. HOARAU

ORSTOM Fonds Documentaire

N° : 28010

Cote : B

ETAT DES CONNAISSANCES AU DEBUT DE L'ETUDE

- La maladie, causée par Xanthomonas vasculorum, a été observée pour la première fois à Madagascar en 1952 par R. ANTOINE dans la région de Tananarive où elle est très répandue, pouvant causer la mort de nombreuses tiges au champ. On pense qu'elle y est systémique, bien qu'on n'ait jamais observé d'exsudation de gomme à la surface de section des tiges.
- Elle n'a jamais été observée sur les régions côtières.
- Elle n'a été observée que sur canne "noble", et même exclusivement sur la variété "Lousier". Un essai de résistance des cannes hybrides a été mis en place par P. BAUDIN à Ambatobe.
- Elle présente deux types de symptômes foliaires souvent juxtaposés sur les mêmes feuilles:
  - a) strie jaune typique, progressant en V, parallèlement à la longueur de la feuille, dans les deux sens à partir du point d'infection, et se nécrosant dans les parties les plus âgées;
  - b) strie rouge atypique, rouge sombre, rappelant fortement les stries de "red-stripe" (Pseudomonas rubrilineans).

Les caractères originaux de la maladie à Madagascar sont :

- le fait qu'elle n'existe pas sur les régions côtières;
- le symptôme de stries rouges. C.G. HUGHES (1) indique que les stries rouges de gommose apparaissent lorsque la maladie est systémique et occupent surtout la partie inférieure des feuilles et même les gaines foliaires. Ceci ne nous paraît pas tout à fait exact : en effet, nous avons observé au champ des stries rouges en infection primaire, et BAUDIN a obtenu des stries rouges en réponse à des inoculations expérimentales.

D'après les études du Dr. HAYWARD sur le comportement comparé de la gommose à Madagascar, à Maurice, à la Réunion

(1)- dans "Sugar-Cane Diseases Of The World" par J.P.MARTIN, 1961  
Elsevier Publishing Company - London - New York.

et au Natal, les souches de Madagascar et du Natal constitueraient un groupe géographique différant par des caractères constants (hydrolyse de l'amidon, de la gélatine, de la caséine, mucosité des colonies, etc...) des souches de Maurice et de la Réunion qui constitueraient un deuxième groupe géographique. Au sein de ces deux groupes géographiques, les souches Mauricienne et Malgache ne peuvent être différenciées respectivement des souches Réunionnaise et du Natal que par réaction variétale de l'hôte : certaines variétés de cannes sensibles à la souche Réunionnaise ne le sont pas à la souche Mauricienne, et il en est de même pour les souches du Natal et de Madagascar.

Un certain nombre de ces données demandent à être précisées, c'est ce qui nous a conduit à adopter le programme de travail suivant :

- Préciser la localisation géographique de la maladie à Madagascar;
- Préciser les <sup>variétés</sup> atteintes;
- Suivre la manifestation des symptômes au cours de la saison et en fonction de l'âge de la canne;
- Faire l'étude comparative des deux types de stries:
  - x du point de vue bactériologique
  - xx du point de vue anatomique
- Etudier la croissance bactérienne en fonction des facteurs extérieurs, et en particulier de la température.

## I- LOCALISATION GEOGRAPHIQUE DE LA MALADIE

Nous avons fait de nombreuses prospections dans la région de Tananarive (1200 m d'altitude) et constaté que la maladie y est partout présente. Au cours d'une tournée dans l'Itasy (1200 m d'altitude) nous avons observé que la maladie existe aussi dans cette région située à environ 150 km de Tananarive : ceci n'avait pas encore été signalé. Nous devons aller prospecter la maladie dans le Nord de l'île, à Bealanana (1400 m d'altitude); ~~mais~~ des raisons matérielles nous ont obligé à remettre cette tournée à une date ultérieure.

Au cours d'une rapide prospection de cultures de cannes dans la région située au pied de la Mandraka, à 900m d'altitude, donc sur le premier Plateau en venant de la Côte Est, nous n'avons pas vu de gommose.

Lors de nos tournées sur la Côte Est nous n'avons jamais vu de gommose, et BAUDIN n'en a jamais observé ni sur

la Côte Est ni sur la Côte Ouest.

Donc, en l'état actuel de nos investigations, la maladie semble être localisée uniquement sur les Hauts-Plateaux. Les résultats de la prospection prochaine à Bealanana et de prospections envisagées dans les zones d'altitude du Sud permettront de dire si elle est généralisée sur tous les Hauts-Plateaux ou si elle se situe uniquement dans un rayon de 150 à 200 km autour de Tananarive.

## II - VARIETES ATTEINTES

Les cultures de cannes aux environs de Tananarive sont essentiellement plantées en variété "Lousier", et cette variété est très sensible.

Dans l'Itasy, la "Lousier" est aussi très attaquée; mais nous avons également observé la maladie sur une variété que nous n'avons pu identifier mais qui ne semble pas être de la "Lousier".

On n'est pas encore en possession des résultats de l'essai gommose pour savoir si les cannes hybrides testées sont sensibles ou non.

## III - MANIFESTATION DES SYMPTOMES AU COURS DE LA SAISON ET EN FONCTION DE L'AGE DE LA CANNE

### A) Saison

Au début de l'été (Novembre), la maladie était visible, mais les symptômes étaient relativement difficiles à trouver. Aux mois de Décembre et de Janvier, la maladie était devenue plus rare. Vers la mi-Février, on a assisté à une véritable explosion de la maladie.

### B) Age de la Canne

L'explosion de la mi-Février était surtout visible sur les cannes ayant déjà un certain âge (plantées depuis 3 ou 4 mois); sur les toutes jeunes cannes on ne voyait aucun symptôme. Par contre, dans l'Itasy une plantation âgée d'environ 1 mois manifestait la maladie : ceci est probablement dû au mode de plantation qui est pratiqué (A Tananarive les boutures sont enfouies, dans l'Itasy elles sont piquées dans le sol).

Il semble donc que la saison et l'âge de la canne influent sur la manifestation des symptômes. Ces observations sont encore trop rudimentaires pour permettre des conclusions sûres; mais elles méritent d'être poursuivies d'une façon plus rigoureuse. On pourrait, à ce propos, envisager d'étudier la variation

de la biochimie de l'hôte (notamment des acides aminés et des sucres) au cours de la saison et en fonction de l'âge de la plante.

#### IV - ETUDE COMPARATIVE DES DEUX TYPES DE STRIES

Un test rapide de détermination de la gommose consiste à prélever un petit fragment de l'extrémité de la strie, à le monter dans une goutte d'eau entre lame et lamelle et à l'observer au microscope : on voit une exsudation de gomme entraînant les bactéries. Cette exsudation est visible avec les deux types de stries, mais généralement beaucoup plus abondante avec les stries typiques.

##### A) ETUDE BACTERIOLOGIQUE

Nous avons fait des isolements à partir des deux types de stries, en effectuant à chaque fois le test ci-dessus. Nous avons varié le plus possible les lieux de prélèvement des échantillons de feuilles (essai gommose d'Ambatobe, route de Majunga, route d'Arivonimamo, route d'Antsirabe, route d'Ambohimanga, Itasy), de façon à déceler éventuellement des variations des souches selon les lieux de provenance.

Les isolements faits à partir de stries typiques ont dans tous les cas donné une seule bactérie : le Xanthomonas vasculorum, agent de la mañadie.

Les isolements faits à partir de stries rouges ont souvent donné plusieurs bactéries (2 à 3) : le X. vasculorum et d'autres bactéries, ces dernières ne semblant pas être obligatoirement les mêmes dans tous les cas. Mais parfois on a obtenu X. vasculorum seul.

L'étude bactériologique comporte donc deux parties : l'étude de X. vasculorum provenant des deux types de stries, et l'étude des autres souches bactériennes.

##### 1) Etude de X. vasculorum

Nous en possédons actuellement 20 souches. Les méthodes et les milieux utilisés pour l'étude biochimique sont en grande partie ceux du Dr. HAYWARD, car il nous a paru indispensable de voir si les résultats obtenus par ce chercheur sur un nombre de souches forcément réduit se confirmaient sur un échantillonnage plus vaste.

##### a) Coloration de Gram

Toutes nos souches sont Gram - .

b) Mobilité

Etudiée par: - examen à l'état frais  
- culture en milieu semi-solide  
Toutes nos souches sont mobiles.

c) Coloration des flagelles

La méthode de Bailey essayée en premier lieu ne donne pas de résultats; par contre, la méthode de Leifson donne de très beaux résultats.

Nous n'avons encore pu soumettre à la coloration de Leifson la totalité de nos souches de X. vasculorum, mais toutes les souches testées jusqu'à présent ont un unique flagelle polaire plus ou moins long, caractéristique du genre Xanthomonas. Nous avons réalisé des microphotographies de ces flagelles, mais notre technique photographique devra être perfectionnée.

d) Utilisation du Citrate

Toutes nos souches sont Citrate + .

e) Tolérance vis-à-vis du NaCl

Toutes nos souches poussent très bien en milieu contenant 3% de NaCl; mais poussent peu ou pas en milieu à 5% de NaCl.

f) Hydrolyse de la gélatine et de l'amidon

Un milieu contenant 0,4% de gélatine ou 0,2% d'amidon est coulé en boîte de Pétri. A l'aide d'un perce-bouchon stérilisé de 5 mm de diamètre intérieur, on fait des trous dans l'agar; on ensemence ces trous avec une anse de 3 mm de diamètre pleine d'une suspension dans de l'eau distillée de bactéries provenant d'une culture de 48 heures sur milieu solide glucosé et peptoné à 2%. HAYWARD laisse incubé 6 jours avant de mesurer les zones d'hydrolyse; ici les infections des cultures nous ont obligé à faire nos mesures au bout de 4 jours d'incubation.

- Gélatine

La zone d'hydrolyse a un diamètre moyen de 21,7 mm au bout de 4 jours. HAYWARD trouve 36,5 mm au bout de 6 jours.

- Amidon

Il n'y a pratiquement pas d'hydrolyse : ce qui concorde avec les observations d'HAYWARD.

g) Utilisation des Hydrates de Carbone

Toutes nos souches de X. vasculorum :

- oxydent :
  - + au bout de 4 jours : glucose, saccharose, xylose, galactose, fructose, mannose;
  - + au bout de 10 jours : glycérol;
- n'oxydent pas:
  - inuline, lactose, raffinose, maltose.

Nous avons encore à tester les produits suivants: mannitol, dulcitol, arabinose, sorbitol, inositol.  
(Ces produits commandés n'ont pas encore été livrés).

Il est également prévu de faire les tests suivants :

- Utilisation des Nitrites
  - Transformation des Nitrates en Nitrites
  - Oxydation du Gluconate
  - Activité lipolytique
  - Activité pectolytique
  - Hydrolyse de la Caséine
  - Utilisation du Malonate
  - Production d'indole
  - Production de  $H_2S$  à partir de la Cystéine
  - Production de  $NH_3$  à partir de l'Urée
  - Production de Tyrosinase
  - Hydrolyse de l'Esculine
  - Coloration des capsules
  - Coloration des vacuoles lipidiques
- ( Les produits nécessaires à l'exécution de ces tests sont attendus).

## 2) Etude des autres souches bactériennes

La détermination des autres souches n'a pu encore être faite : nous attendons d'être en possession de tous les produits nécessaires pour faire l'étude complète de ces bactéries.

## B) EXPERIENCES D'INOCULATION

Des cannes de la variété "Lousier" ont été plantées en serre et pourront être inoculées d'ici 1 mois.

Ces inoculations sont entreprises dans l'espoir de pouvoir déterminer si l'obtention éventuelle de stries rouges à la suite d'inoculations est due au X. vasculorum seul

ou à une association de X. vasculorum avec l'une des autres bactéries isolées de stries rouges. En outre, ces inoculations pourraient ~~de~~ déterminer si ces autres bactéries ont un rôle parasitaire ou ne sont que de simples saprophytes.

Nous envisageons donc les traitements suivants :

- Inoculation avec X. vasculorum isolé de stries typiques
- Inoculation avec X. vasculorum isolé de stries rouges
- Inoculation avec les autres souches bactériennes
- ± Inoculation éventuelle avec une association X. vasculo-  
rum et autre bactérie de strie rouge

Nous ferons aussi des inoculations en utilisant différentes doses d'inoculum, un taux plus ou moins massif d'inoculum pouvant peut-être induire la formation de tel type de strie plutôt que de tel autre.

### C) ETUDE ANATOMIQUE

Il est supposé que le symptôme de strie typique correspond à une localisation vasculaire de la bactérie, tandis que dans le cas des stries rouges la bactérie passe dans le parenchyme. L'étude anatomique et histologique comparée des stries peut apporter des éléments intéressants à ce propos.

D'autre part, une telle étude peut être un moyen détourné d'approcher la question de la nature et de l'origine de la gomme. Par exemple, la présence éventuelle de thylles gommeuses dans les vaisseaux indiquerait que la gomme a une nature végétale et non bactérienne.

Nous <sup>ne</sup> sommes qu'au tout début de cette étude; nous venons juste de mettre au point le protocole. Le premier problème qui se pose est celui de la fixation des gommages à l'intérieur des tissus, car nous avons dit qu'en milieu aqueux les gommages exsudent par suite de leur gonflement. Après plusieurs essais de fixation, nous avons pu contrôler qu'en appliquant la méthode ci-après il n'y a aucune exsudation jusqu'à l'inclusion dans la paraffine :

- Fixation par le fixateur de Morel-Dalous (1) : 1 heure
- 2 passages à l'alcool absolu de  $\frac{1}{2}$  heure chacun
- 3 passages au xylol de  $\frac{1}{2}$  heure chacun
- 3 passages à la paraffine de  $\frac{1}{2}$  heures chacun
- Inclusion à la paraffine

(1) dans " Manuel De Technique Botanique" par P. DOD et A. GAUTIER

Les coupes seront faites transversalement et longitudinalement, et subiront le traitement suivant :

- 3 bains de xylol pour déparaffinage
  - 2 bains d'alcool absolu
  - 1 bain d'alcool à 90%
  - 1 bain d'alcool à 70%
- (il n'y a pas d'exsudation dans ces alcools dilués)
- Passage au sous-acétate de Plomb qui coagule les gommes et les rend ultérieurement insolubles (1).
  - Lavage à l'eau
  - Coloration par le bleu de méthylène aluné qui colore différemment les différents tissus (1)
  - Coloration par le rouge de ruthénium, colorant des gommes que celles-ci soient pectiques ou cellulosiques (1)
  - Lavage à l'eau
  - Déshydratation pour montage au Baume du Canada.

#### V - ETUDE DE LA CROISSANCE BACTERIENNE "IN VITRO"

Cette étude se fera par turbidimétrie. Nous l'avions déjà commencé, mais avons dû l'interrompre, le photolorimètre ne fonctionnant plus.

Avant d'aborder une telle étude, nous avons dû mettre au point divers facteurs :

- Choix d'un milieu synthétique stable du point de vue absorptiométrie. Le milieu synthétique de MONOD (2) modifié par diminution de la proportion du  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  (0,1% au lieu de 0,2%) et de celle du  $\text{FeSO}_4$  (0,0001% au lieu de 0,0005%) pour éliminer les précipitations, convient parfaitement.
- Choix de la nature et de la proportion du sucre à ajouter à ce milieu synthétique pour servir de source carbonée. assurant à la bactérie la meilleure croissance. On peut utiliser indifféremment le glucose ou le saccharose à la dose de 500 mg / Litre de milieu.
- Choix d'une longueur de travail : ceci dépend du photolorimètre utilisé.
- Vérification que les indications du photolorimètre sont effectivement proportionnelles à l'accroissement réel des cultures. Ceci se fait en deux temps :

(1)- dans "Précis de Microscopie" de LANGERON

(2)- dans "Croissance des Cultures Bactériennes" par J. MONOD



Temps 1 : Vérifier que la lecture au photocolorimètre est proportionnelle à la concentration en bactéries de la suspension.

Temps 2 : Vérifier que le rapport entre les graduations de l'appareil et le poids sec de bactéries contenues dans la suspension est constant. Pour cela, on centrifuge un volume déterminé d'une culture en milieu synthétique (additionné de sucre) après avoir pris la densité optique de cette culture et on fait le poids sec. On répète cette opération un certain nombre de fois sur des cultures qui sont à des stades de croissance différents, et on doit vérifier que le rapport Poids sec / Densité optique est constant. Ainsi, connaissant la densité optique d'une culture dans le milieu utilisé, on peut en déduire avec une approximation suffisante le poids de substance bactérienne que contient cette culture.

Ce n'est qu'une fois ce travail préalable exécuté que l'on peut entreprendre l'étude turbidimétrique de la croissance bactérienne.

#### A) CROISSANCE EN FONCTION DE LA TEMPERATURE

On soumet des cultures bactériennes à des températures variables, et, à des temps déterminés, on mesure la densité optique. On peut ainsi déterminer la température optimale de croissance de la bactérie, et tracer la courbe de croissance en fonction de la température.

Nous disposons, pour ce genre d'études d'un banc formant pont entre une étuve et un réfrigérateur qui nous permet d'obtenir des températures échelonnées d'environ 6°C à 41°C de 1°C $\frac{1}{2}$  en 1°C $\frac{1}{2}$  à peu près. Les variations pour chaque température sont de l'ordre du degré. On peut faire 6 répétitions d'un coup pour une même température.. (Nous en étions à ce point lorsque le photocolorimètre est tombé en panne).

Cette <sup>étude</sup> est très intéressante, car il n'est pas exclu que l'absence de la maladie sur la région côtière soit conditionnée, directement ou indirectement, par la température. D'ailleurs le fait que la maladie semble régresser sur les Hauts-Plateaux pendant l'été inciterait à le penser.

#### B) COURBE DE CROISSANCE DE LA BACTERIE

La température optimale une fois établie, il sera très intéressant d'établir la courbe de croissance de la bactérie à cette température, et de mettre ainsi en évidence la

durée et l'importance relatives des différentes <sup>phases</sup> de croissance: phase de latence, phase de croissance exponentielle, phases de ralentissement et d'arrêt de la croissance, phase de décroissance.

Ceci sera très utile pour étudier ultérieurement la croissance de la bactérie en fonction de la nature et de la proportion des aliments fournis?

---

Il ressort de cet exposé que le programme tracé n'a reçu qu'un début d'exécution. Des circonstances inattendues en ont retardé le déroulement normal. L'étude turbidimétrique aurait dû être terminée, et l'étude biochimique de X. vasculorum et la détermination des autres bactéries en bonne voie d'achèvement.

Quoi qu'il en soit, cette étude n'a pas été conçue dans l'esprit de former un tout en soi : elle constitue en quelque sorte un préambule au travail dont nous aurons à nous occuper à la Réunion. Les résultats obtenus ici pourront, sinon être transposés à la Réunion, du moins nous permettre d'avancer plus rapidement.

A la Réunion, nous l'avons signalé, les cannes hybrides industrielles sont attaquées; pour beaucoup d'entre elles la maladie est systémique et il y a une importante teneur en gomme dans la tige. Dans l'immédiat, il faudra axer les efforts sur le plan génétique pour trouver rapidement des variétés résistantes, éliminer les grands foyers d'infection entretenus par l'utilisation encore fréquente de la variété R 397 très atteinte, rechercher s'il existe des hôtes spontanés, etc... Pour toutes ces questions, une connaissance approfondie de l'agent pathogène est indispensable. Et la présente étude nous aura au moins donné une ligne de conduite.

Enfin, la présence de gomme dans les tiges des cannes industrielles pose un problème technologique en sucrerie. C'est pourquoi nous envisageons l'étude micro-biochimique des gommes, bien que nous n'ayons encore aucune idée sur la manière dont nous allons l'aborder.