

Etude de souches de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (HASSE, 1915) DYE 1978 isolées de l'île de la Réunion. Caractères bactériologiques. Comportement épiphyte. Pouvoir pathogène.

J. LAVILLE

ETUDE DE SOUCHES DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CITRI* (HASSE, 1915) DYE 1978 ISOLEES DE L'ILE DE LA REUNION.

Caractères bactériologiques. Comportement épiphyte. Pouvoir pathogène.

J. LAVILLE

Fruits, Nov. 1985, vol. 40, n° 11, p. 719-738.

RESUME - Le chancre citrique des agrumes est une affection bactérienne occasionnée par *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. La classification actuelle en chancres A, B et C, repose d'une part sur des spécificités d'hôtes et d'autre part sur des différences biochimiques, physiologiques, sérologiques et lysotypiques.

L'ensemble des études effectuées donne un aperçu de la variabilité des populations pathogènes du pv. *citri* dans l'île de la Réunion. Cette variabilité s'exprime par des différences des caractéristiques physiologiques (croissance, couleur, forme), biochimiques (milieu de culture spécifique), sérologiques (immunofluorescence indirecte) et lysotypiques (bactériophages) des souches. La sensibilité des souches aux antibiotiques utilisés confirme la différence des souches de la Réunion avec la souche de référence du chancre B. L'analyse génétique indique la présence de plasmides (méthode d'Eckhardt). L'étude du pouvoir pathogène (inoculation de 32 souches sur 5 espèces de *Citrus*) n'a pas mis en évidence un spectre d'hôtes différent selon les souches et le type de chancre.

Au plan biologique, on constate que la bactérie n'est capable de survivre que temporairement sur l'arbre et que la réalisation de son cycle d'infection semble nécessiter la présence de blessures.

Cette étude a été réalisée sous la direction scientifique de J. LUISETTI (Station de Pathologie végétale, INRA, Angers, France) dans le cadre du D.E.A. de Phytopathologie de l'Université de Paris-Sud Orsay (MM. les Professeurs CHEVAUGEON, COLENO, BOMPEIX).

INTRODUCTION

Le chancre citrique est une affection bactérienne occasionnée par *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (HASSE, 1915) DYE, 1978.

La maladie est endémique dans toute l'Asie du sud-est, l'Indonésie, les Philippines et la Polynésie. Elle est importante en Amérique du sud et en Afrique australe. La bactérie n'a cependant jamais été trouvée dans le Bassin méditerranéen (BRUN, 1971).

La classification actuelle en chancres A, B et C, repose sur l'origine géographique, la spécificité d'hôtes et sur des caractères physiologiques, biochimiques, sérologiques et lysotypiques des souches (WAKIMOTO, 1967).

En 1970, BRUN signalait la maladie à la Réunion sur combava (*Citrus hystrix*), grapefruit (*Citrus paradisi*) et lime mexicaine (*Citrus aurantifolia*) ainsi que sur oranger (*Citrus sinensis*) et citronnier (*Citrus limonia*) en région humide.

Devant l'augmentation, depuis 1980, des dégâts provo-

qués par cette maladie dans la citriculture réunionnaise, l'INRA d'Angers et la Station de recherches de l'IRFA de la Réunion ont mis en place un programme de recherches visant à déterminer les caractéristiques biologiques et épidémiologiques des populations pathogènes afin de proposer des moyens de lutte efficace dans le contexte économique de l'île.

Une première étude (LAVILLE, 1982) des caractéristiques physiologiques, biochimiques, sérologiques et lysotypiques des souches, a montré que le chancre citrique à la Réunion s'apparente aux chancres A ou C mais jamais au chancre B.

Une seconde étude (LAVILLE, 1983) nous a permis de préciser les caractéristiques du pv. *citri* à la Réunion, sa place au sein de la classification en chancres A, B et C. Pour cela, nous avons entrepris, d'une part une analyse plasmidique des souches (en comparaison avec les souches références des chancres A, B et C) et une étude de la sensibilité aux antibiotiques. D'autre part, l'inoculation des souches à 5 espèces de *Citrus* permet une évaluation de leur pouvoir pathogène et une estimation de la sensibilité des espèces. Enfin, l'étude du comportement épiphyte de la bactérie pose les premières bases de la connaissance de l'épidémiologie de la maladie.

MATERIELS ET METHODES

Isolement des souches.

Après examen visuel des symptômes, l'isolement des bactéries à partir des échantillons de plantes se fait selon différentes modalités :

- agitation pendant 4 heures de 20 feuilles dans un Erlenmeyer contenant 200 ml d'eau distillée stérile ;
- dilacération des zones nécrosées dans 4,5 ml d'eau distillée (on laisse en contact pendant 1 heure) ;
- broyage des feuilles ; 10 ml d'eau distillée stérile par feuille (Waring Blendor ou Ultra-turrax).

Une goutte (1/10 ml) de l'eau de macération est ensuite déposée à la pipette sur un milieu de culture gélosé en boîte de Pétri (LPGA : extrait de levure 7 g ; bactopectone 7 g ; glucose 7 g ; agar 15 g ; eau distillée 1 000 ml ; pH 7,2 ; cycloheximide 50 ppm) et étalée en trois secteurs afin d'opérer une séparation des germes. L'incubation se fait à 28°C pendant 3-4 jours.

Parmi les nombreuses colonies qui apparaissent, une première sélection est effectuée sur la couleur (jaune), la forme (bombée), l'aspect muqueux et brillant, la régularité des contours. Les colonies répondant à ses premiers critères sont prélevées et repiquées sur un milieu de culture gélosé (LPGA) en tube pour constituer le clone bactérien.

Milieu sélectif.

Nous avons également utilisé pour l'isolement un milieu de culture mis au point par le Dr. MICHAULT (la Réunion) pour sélectionner les *Xanthomonas* (Muller-Hinton 35 g ; esculine 1 g ; citrate de fer ammoniacal 1 g ; eau distillée 1 000 ml ; mezlocilline 32 ppm ; céfalotine 33 ppm ; cycloheximide 500 ppm). Sur ce milieu, les colonies du pv. *citri* sont bombées, muqueuses, hydrolysant l'esculine (précipité noir), mais sont plus petites (de moitié environ) que sur milieu LPGA.

Par ailleurs, ce milieu sélectif a été testé sur les souches déjà isolées de *Citrus* et sur d'autres espèces bactériennes de la collection de l'INRA d'Angers.

Le *X. c. pv. citri* possède les caractères bactériologiques suivants :

Gram	-
Flagelle (méthode de Rhodes)	1 polaire oxydatif
Hugh et Leifson	-
Réduction nitrates en nitrites	-
Cytochrome C oxydase	-
Hypersensibilité sur tabac	+
Hydrolyse de l'amidon	+
Production H ₂ S	+
Esculine	+

Conservation des souches.

- Les souches sont conservées :
- sur milieu LPGA en tube à 28°C avec un repiquage tous les 4 jours ;
 - sur milieu LPGA en tube à 16°C avec un repiquage tous les 7 jours ;
 - en suspension en eau stérile maintenue au congélateur à -30°C.

Caractérisation des souches.

Utilisation de substrats carbonés.

Les souches sont testées pour leur capacité à utiliser une gamme de sucres et d'acides organiques comme seule source de carbone.

Le substrat carboné est incorporé (5 p. 1000) dans un milieu gélosé de base (ARJ) et coulé en boîte de Pétri.

Les souches (10⁸ bactéries/ml) sont ensemencées en spots (5 spots par boîte) à l'aide d'un multi-ensemencement de Steers.

L'incubation se fait à 28°C et les lectures à 5, 8 et 15 jours après ensemencement.

Sérologie.

Nous disposons actuellement de sept sérums de lapin antibactériens : anti JA 143, anti JA 151-1, anti JA 151-5, anti JA 151-8, anti JB 3-6, anti JB 3-7, anti JB 3-8, ainsi que d'un sérum de chèvre fluorescent antigammaglobulines de lapin.

La technique utilisée est celle de l'immunofluorescence indirecte.

Sur des lames spéciales pour l'immunofluorescence, on dépose 10 ml d'une solution d'antigène (10^7 bactéries/ml) par spot.

Le sérum de lapin est dilué aux 1/10, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400, 1/12800.

Le sérum de chèvre fluorescent est dilué au 1/300.

Sensibilité aux bactériophages.

Les souches sont testées vis-à-vis de leur sensibilité aux bactériophages XC₁, XC₃, XC₄, XC₅, Cp₁, Cp₂ et Cp₃ en vue d'établir leur lysotypie.

XC₁ est un bactériophage virulent isolé de sol que nous avons multiplié sur JA 143.

XC₃ est un bactériophage tempéré isolé de JA 151-1 que nous avons multiplié sur cette même souche.

XC₄ est un bactériophage tempéré isolé de JA 151-1 que nous avons multiplié sur JA 151-5.

XC₅ est un bactériophage tempéré isolé de JB 3-8 que nous avons multiplié sur cette même souche.

Les bactériophages Cp₁, Cp₂ et Cp₃ ont été isolés au Japon et sont utilisés comme référence.

Cp₁ et Cp₂ sont des bactériophages tempérés isolés de bactéries phytopathogènes et sont multipliés respectivement sur JB 3-7 et JA 143.

Cp₃ est un bactériophage virulent isolé de sol que nous avons multiplié sur JB 3-8.

Avant leur utilisation, les bactériophages sont préalablement multipliés pour obtenir une suspension phagique finale d'environ 10^8 à 10^{12} u.f. p./ml.

Lors du test de sensibilité sur bactériophages, la bactérie est ensemencée en nappe sur boîte de Pétri contenant un milieu nutritif gélosé (LPGA) sur laquelle on dépose ensuite 0,05 ml de chaque dilution de la suspension phagique (dilution : 0, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}).

Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 15 heures environ. La lecture se fait par appréciation de l'importance de la surface lysée aux différentes dilutions et en tenant compte du témoin.

Antibiogrammes.

A partir d'une culture pure, on ensemence 4,5 ml de milieu N (Nutrient broth 4,5 g ; extrait de levure 2 g ; glutamate de sodium 2 g ; eau distillée 1 000 ml ; pH 7) jusqu'à l'obtention d'une opacité visible.

Pour ensemencer le milieu gélosé (LPGA) en boîte de Pétri : on verse quelques millilitres de la suspension obtenue sur la gélose de façon à inonder complètement la surface du milieu, on élimine l'excès de liquide, puis on laisse sécher la boîte 15 minutes. L'inoculum doit permettre une culture suffisamment dense.

Les disques pour antibiogrammes (Institut Pasteur) (tableau 1) sont déposés sur la gélose selon un schéma normalisé. Les boîtes sont mises à incuber à 28°C pendant 24 à 36 heures.

Analyse des plasmides.

Les différences entre les couches de référence des chancres A, B et C, reposeraient sur des bases d'ordre génétique. L'objectif de cette analyse de plasmides est de savoir si ces différences se trouvent éventuellement au niveau plasmidique (CIVEROLO, 1982).

L'électrophorèse en gel d'agarose (méthode d'Eckhardt) est utilisée pour l'analyse génétique des souches isolées de *Citrus* de la Réunion. Vingt-deux souches dont quinze pv. *citri* ont été ainsi étudiées.

Sélection de souches résistantes aux antibiotiques.

La sélection de souches résistantes aux antibiotiques entre dans le cadre des recherches épidémiologiques. Ces souches résistantes pouvant être facilement résolées sur milieu spécifique (milieu complexe additionné de l'antibiotique concerné) après inoculation expérimentale sur un végétal.

Une suspension dense (10^9 - 10^{10} cfu/ml) de la souche JA 143 est ensemencée sur des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé (LPGA) additionné de l'un des quatre antibiotiques (250 ppm) suivants :

- Kanamycine (Kanamycine 242 THERAPLIX),
- Novobiocine (Novobiocin N-1628 SIGMA),
- Streptomycine (Streptomycinsulfat Art. 10117 MERCK),
- Rifamycine (Rifamycin R 8626 SIGMA).

TABLEAU 1 - Liste des antibiotiques utilisés pour la réalisation des antibiogrammes.

Groupes	Dénomination	Charge en μg ou unités
β Lactamines	Carbénicilline	100 μg
	Céfalotine	30 UI
	Céfuroxime	30 μg
	Céfamandole	30 μg
	Céfotaxime	30 μg
Aminosides	Streptomycine	10 UI
	Kanamycine	30 UI
	Gentamicine	10 UI
	Sisomicine	10 μg
Tétracyclines	Oxytétracycline	30 UI
Macrolides et apparentés	Erythromycine	15 UI
	Clindamycine	2 UI
Phenicols	Chloramphénicol	30 μg
Rifamycines	Rifampicine	30 μg
Quinolones	Acide nalidixique	30 μg
	Fluméquine	30 μg
Sulfamides	Triméthoprim-Sulfamides	T - 1,25 μg + S - 23,75 μg
Divers	Novobiocine	30 UI
	Fosfomycine	50 μg

Les boîtes sont mises à incuber à 28°C jusqu'à apparition de colonies (2 à 15 jours), Les colonies sont alors prélevées pour identification et contrôle de la résistance.

Etude du comportement épiphyllé de X.c. pv. citri sur agrumes.

Deux cents millilitres d'une suspension dense (10^8 cfu/ml) de la souche JA 143 str1 résistante à la streptomycine sont pulvérisés sur *Citrus* âgés de 3 ans. Nous avons mené cette expérience sur tangelo Orlando et *Poncirus trifoliata*.

Un échantillon de 20 feuilles est prélevé régulièrement sur les arbres (4 feuilles par arbre). On réalise ensuite successivement une empreinte de chaque feuille sur un milieu gélosé en boîte de Pétri et un lavage des 20 feuilles dans 200 ml d'eau distillée stérile pendant 4 heures.

A partir d'une série de dilution (0 à 10^4) de l'eau de lavage, on fait une numérotation de colonies par étalement de 0,2 ml de chaque dilution sur un milieu gélosé en boîte (2 répétitions) et une estimation de la population par la technique d'immunofluorescence indirecte (sérum JA 143 dilué au 1/3000, sérum fluorescent dilué au 1/300).

Le milieu gélosé pour cette expérience est le milieu LPGA additionné de cycloheximide (50 ppm) et de streptomycine (50 ppm) qui permet la sélection de la souche JA 143 str1 et facilite la numération des colonies du *p. citri*.

Etude du pouvoir pathogène.

● Inoculation.

Trente-deux souches isolées de *Citrus* ont été inoculées à 5 espèces de *Citrus* âgées de 3 ans : tangelo Orlando, *C. volkameriana*, *C. sinensis* var. Madame Vinous, *P. trifoliata* et *C. aurantifolia*.

Pour chaque souche, un inoculum dense (10^8 cfu/ml) est préparé dans 4,5 ml d'eau distillée stérile. La suspension bactérienne est prélevée à l'aide d'une seringue. On réalise alors une piqûre au travers de la feuille et on dépose une goutte de l'inoculum sur la face supérieure de la feuille au niveau de la piqûre. On inocule ainsi pour chaque souche 5 feuilles par espèce de *Citrus* et sur chaque feuille, on effectue 10 piqûres (5 de chaque côté de la nervure centrale).

Pour faciliter le développement de la maladie, les arbres sont maintenus sous serre (30 à 40°C) et forte humidité (arrosages au sol fréquents).

● Réisolement et caractérisation.

Soixante-six jours après inoculation, les feuilles inoculées de tangelo Orlando ont été prélevées. Les feuilles inoculées par la même souche sont broyées ensemble au Waring-Blendor (10 ml d'eau distillée stérile par feuille). Le broyat est dilué (0 à 10⁴) et fait l'objet d'une numération de colonies par étalement sur boîte de Pétri (milieu LPGA) et une estimation de la population par la technique d'immuno-fluorescence (sérum JA 143, JB 3-7 ou JB 3-8 dilué au 1/3000 ; sérum fluorescent dilué au 1/300). Les colonies qui apparaissent lors de la numération sur boîte font l'objet d'une caractérisation rapide du pv. *citri*.

RESULTATS

Origine des souches.

A partir des échantillons de *Citrus* provenant de la Réunion, une cinquantaine de souches ont été isolées (tableau 2).

Caractères généraux des souches.

La taille des colonies après 3 jours d'inoculation à 28°C peut varier d'une souche à une autre. Elle se situe entre 1 et 2 mm.

TABLEAU 2 - Origine des souches.

Souches	Isolées de
JA 143	<i>Citrus</i> sp.
JA 151-1	Oranger (<i>Citrus sinensis</i>)
JA 151-5	Oranger
JA 151-8	Clémentinier (<i>Citrus nobilis</i> x <i>Citrus salicifolia</i>)
JA 159-1	Clémentinier
JA 162-5	Citronnier (<i>Citrus limonia</i>)
JA 163-2	<i>Citrus</i> sp.
JA 163-4	Oranger
JA 163-5	Clémentinier
JA 167-2	<i>Citrus</i> sp.
JB 3-1	Oranger
JB 3-2	Clémentinier
JB 3-3	Lime mexicaine (<i>Citrus aurantifolia</i>)
JB 3-4	Lime mexicaine
JB 3-5	Citronnier
JB 3-6	Souche référence du chancre C (CIVEROLO E.)
JB 3-7	Souche référence du chancre A (CIVEROLO E.)
JB 3-8	Souche référence du chancre B (CIVEROLO E.)
JB 50-(1a, 2a, 3)	Combava (<i>Citrus hystrix</i>)
JB 50-(8a, 8b)	Combava
JB 50-(10a, 10b)	Combava
JB 53-(1a à 1h)	Oranger
JB 53-(21a à 21c)	Lime de Tahiti
JB 53-(22a à 22c)	Lime de Tahiti
JB 53-(31a, 31b, 32)	Combava
JB 93-1	Citronnier
JB 93-3	Clémentinier
JB 93-4	Oranger
JB 93-7	Combava
JB 93-9	Lime de Tahiti
JC 7	Citronnier
JC 13-(1 à 7)	<i>Citrus</i> sp. (AUBERT B.)
JC 26-2	Combava
JC 27-1	Citronnier
JC 27-2	Citronnier

TABLEAU 3 - Caractères généraux des souches.

Test Souches	Test								Diagnostic
	Gram	Esculine	Hugh et Leifson	Production H ₂ S	Réduction des nitrates	Hydrolyse de l'amidon	Tabac	Flagelle	
JA 143	-	+	ox		-	+	+	1 polaire	<i>Xanthomonas</i> probable
JA 151-1	-	+	ox		-	+	+		" "
JA 151-5	-	+	ox		-	+	+		" "
JA 151-8	-	+	ox		-	+	+		" "
JA 159-1	-	+	ox		-	+	+		" "
JA 162-5	-	+	ox		-	-	+		" "
JA 163-2	-	+	ox		-	+	+		" "
JA 163-4	-	+	ox		-	+	+		" "
JA 163-5	-	+	ox		-	+	+		" "
JA 167-2	-	+	ox		-	+	+		" "
JB 3-1	-	+	ox	+	-	+	+		" "
JB 3-2	-	+	ox	+	-	+	+		" "
JB 3-3	-	+	ox	-	-	+	+	1 polaire	" "
JB 3-4	-	+	ox	+	-	+	+	1 polaire	" "
JB 3-5	-	+	ox	+	-	+	+		" "
JB 3-6	-	+	ox	+	-	+	+	1 polaire	souche réf. du chancre C
JB 3-7	-	+	ox	+	-	+	+	1 polaire	souche réf. du chancre A
JB 3-8	-	+	ox	+	-	+	+	1 polaire	souche réf. du chancre B
JB 50-1a	-	+	ox	+	-	+	+	1 polaire	<i>Xanthomonas</i> probable
JB 50-1b	-	+	fe		+				non X.
JB 50-2a	-	+	ox	+	-	-	+		" "
JB 50-2b	-	+	ox	+	-		+		" "
JB 50-3	-	-	ox	+	-		+		" "
JB 50-4	-	+	ox	+	-	+	+		" "
JB 50-5	-	+	ox	-	-	-	+		" "
JB 50-6	-	+	ox	-	-	-	+		" "
JB 50-7	-	+	ox	-	-				" "
JB 50-8a	-	+	ox	+	-	+	+		X. probable
JB 50-8b	-	+	ox	+	-	-	+		non X.
JB 50-9	-	+	fe		+				" "
JB 50-10a	-	+	ox	+	-	+	+	1 polaire	X. probable
JB 50-10b	-	+	ox	+	-	+	+	1 polaire	" "
JB 51	-		fe						Non X.
JB 52-1	-	-	ox	-	-		+		" "
JB 52-2	-	+	fe						" "
JB 52-3	-	+	fe						" "
JB 53-1a	-	+	ox	+	-	-	+		Non X.
JB 53-1b	-	+	ox	+	-	+	+	1 polaire	X. probable
JB 53-1c	-								Ne pousse pas
JB 53-1d	-	+	ox	+	-	-	+		Non X.
JB 53-1e	-		fe						" "
JB 53-1f	-	+	ox	+	-	-	+		" "
JB 53-1g	-	+	ox	+	-	-	+		" "
JB 53-1h	-	-	ox	-	+	+	+		" "
JB 53-21a	-	+	ox	+	-	+	+		X. probable
JB 53-21b	-	-		+	-	-	+		Non X.
JB 53-21c	-	-	ox	+	-	-	+		" "
JB 53-22a	-	+	ox	+	-	-	+		" "
JB 53-22b	-	+		-	-	-	+		" "
JB 53-22c	-	+	ox	+	-	-	+		" "
JB 53-31a	-	+	fe		+	+			" "
JB 53-31b	-	+	ox	+	-	-	+		" "
JB 53-32a	-	-	ox		+	-			" "

La vitesse de croissance sur milieu LPGA est assez homogène pour l'ensemble des souches à l'exception de JB 3-3 et JB 3-4 qui ont une croissance plus lente.

La couleur des souches varie du jaune paille au jaune orangé. Les nuances de couleur dans le jaune sont cependant fonction, pour une même souche, de la température de croissance et de l'âge de la culture.

La couleur est néanmoins importante dans la détermination du genre *Xanthomonas* (tableau 3).

Il est important de noter que les souches JC 13-1 à JC 13-7 isolées sur le milieu sélectif ne présentent que très peu de parenté avec le pv. *citri*. Si la plupart des autres souches possèdent les caractères bactériologiques du pv. *citri*, certaines d'entre elles présentent des anomalies :

- JB 3-3, JC 7 et JC 13-5 ne produisent pas d'H₂S ;
- JA 162-5, JB 93-4, JC 13-1, JC 13-2, JC 13-3, JC 13-5, JC 13-6 et JC 13-7 n'hydrolysent pas l'amidon ;
- JC 7, JC 13-1 à JC 13-7 et JC 26-2 ne provoquent pas de réaction d'hypersensibilité sur tabac.

Milieu sélectif.

Trente-cinq souches isolées de *Citrus* et vingt autres espèces bactériennes appartenant aux 5 genres de bactéries phytopathogènes ont été criblées sur le milieu sélectif afin d'en connaître le spectre d'action (tableau 4).

Toutes les souches du pv. *citri* poussent correctement sur ce milieu, les colonies formées restant cependant plus petites que sur le milieu LPGA.

TABLEAU 4 - Croissance des souches sur le milieu sélectif (MICHAULT).

souches isolées de Citrus		autres espèces bactériennes	
JA 143 *	+	<i>P. solanacearum</i>	-
JA 151-1 *	+	<i>P. persicae</i>	+
JA 151-5 *	+	<i>P. syringae</i>	+
JA 151-8 *	+	<i>P. mors-prunorum</i>	+
JA 159-1 *	+	<i>P. tomato</i>	+
JA 162-5 *	+	<i>P. viridiflava</i>	+
JA 163-4 *	+	<i>P. cichorii</i>	+
JA 163-5 *	+	<i>P. marginalis</i>	+
JA 167-2 *	+	<i>P. fluorescens</i>	+
JB 3-1 *	+	<i>X. campestris</i>	+
JB 3-2 *	+	<i>X. corylina</i>	-
JB 3-3 ●	-	<i>X. juglandis</i>	+
JB 3-4 ●	-	<i>X. pelargoni</i>	-
JB 3-5 *	+	<i>E. carotovora</i>	-
JB 3-6 *	+	<i>E. chrysanthemi</i>	-
JB 3-7 *	+	<i>E. rhapontici</i>	+
JB 3-8 *	±	<i>C. fascians</i>	-
JB 50-1 *	+	<i>C. flaccumfaciens</i>	±
JB 50-8 ●	-	<i>C. michiganense</i>	-
JB 50-10a *	+	<i>A. tumefaciens</i>	-
JB 50-10b *	+		
JB 53-1 *	+		
JB 53-21 ●	-		
JB 93-1 *	+		
JB 93-3 *	+		
JB 93-4	±		
JB 93-7 *	+		
JB 93-9	+		
JB 13-1	+		
JB 13-2 ●	+		
JB 13-3 ●	+		
JB 13-4 ●	+		
JB 13-5	+		
JB 13-6 ●	+		
JB 13-7 ●	+		

Lecture à trois jours	
+	Croissance forte
±	Croissance faible
-	Croissance nulle
*	<i>Xanthomonas citri</i>
●	non <i>Xanthomonas citri</i>

Si ce milieu n'est pas d'une totale efficacité, il permet toutefois l'élimination d'un certain nombre d'espèces bactériennes et facilite ainsi l'isolement du pv. citri. On se doit cependant de rester prudent lors de l'utilisation de ce milieu et de confirmer par les tests classiques de caractérisation, l'appartenance de la bactérie isolée au pv. citri. Les souches JC 13-1 à JC 13-7 poussant correctement sur ce milieu, mais n'appartenant pas au pv. citri, sont un bon exemple des limites de l'intérêt d'un milieu sélectif.

Utilisation des substrats carbonés.

Le tableau 5 regroupe les résultats de croissance sur les

différentes sources de carbone observés après 8 jours d'incubation à 28°C (15 jours pour JB 159-1. de croissance très lente sur milieu minéral).

Les souches de références JB 3-7 (chancre A), JB 3-8 (chancre B) et JB 3-6 (chancre C) se distinguent par un certain nombre de caractères :

Alors que JB 3-7 utilise le maltose et le lactose, JB 3-6 utilise en plus l'amidon et le malate, JB 3-8 ne pousse sur aucun de ces substrats carbonés.

Contrairement aux observations de GOTO (1980) aucune souche n'utilise le citrate.

TABLEAU 5 - Utilisation des substrats carbonés par les souches isolées de divers échantillons d'agrumes en provenance de la Réunion.

Souches	Types de chancres		
	A	B	C
	JB 3-7 *	JB 3-8 *	JB 3-6 *
	JA 143 *	JA 151-1 *	JA 151-5 *
	JA 151-8 *	JA 159-1 *o	JA 162-5 *
	JA 163-2 *	JA 163-4 *	JA 163-5 *
	JA 167-2 *	JB 3-1 *	JB 3-2 *
	JB 3-3 ●	JB 3-4 ●	JB 3-5 *
	JB 50-1a	JB 50-2a ●	JB 50-3 ●
	JB 50-8a	JB 50-8b ●	JB 50-10a *
	JB 50-10b *	JB 53-1a	JB 53-1b
	JB 53-1d	JB 53-1f ●	JB 53-1g
	JB 53-21a	JB 53-22a ●	JB 53-22c ●
	JB 53-31b ●		
Substrats	JB 3-7 *	JB 3-8 *	JB 3-6 *
Arabinose	+	-	-
Rhamnose	-	-	-
Xylose	±	+	+
Glucose	+	+	+
Fructose	-	+	+
D (+) Galactose	+	+	+
Mannose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Tréhalose	+	+	+
Saccharose	-	+	+
Raffinose	-	-	+
α Méthyl D Glucoside	-	-	-
Salicin	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
Dulcitol	-	-	-
Glycerol	-	+	+
Mannitol	+	+	+
Amidon	-	-	+
Gluconate	-	-	-
Oxalate	-	-	-
Acétate	-	-	-
Tartrate	-	-	-
Malonate	-	-	+
Citrate	-	-	-
Succinate	+	+	+
Malate	-	-	+

Lecture à 8 jours - Croissance à 28°C

o Lecture à 15 jours - * *Xanthomonas citri* ● non *Xanthomonas citri*

+ Croissance forte ± Croissance faible - Croissance nulle

Les caractères sorbitol négatif et inositol négatif des souches confirment leur appartenance à l'espèce *Xanthomonas campestris*.

Les résultats montrent des différences importantes au niveau de l'utilisation de 5 substrats carbonés : le maltose, le lactose, l'amidon, le malonate et le malate.

Il est important de signaler qu'aucune souche de *pv. citri* isolée de la Réunion ne correspond par ses caractères biochimiques à la souche référence du chancre B (JB 3-8).

Les souches JB 3-2, JB 3-3, JB 3-4 et JA 167-2 ne peuvent être identifiées à une des souches de référence.

Ces résultats, en plus des tests de détermination, nous ont permis de sélectionner les souches apparentées à l'espèce *Xanthomonas campestris pv. citri*.

Les souches JB 53-1a, JB 53-1d, JB 53-1g, JB 53-21a, ne poussant sur aucun des milieux, sont éliminées.

Les souches JB 50-2a, JB 50-3, JB 50-8b, JB 53-1f, JB 53-22a, JB 53-22c, JB 53-31b, utilisant un ou plusieurs des composés carbonés suivants : rhamnose, D méthyl D glucoside, sorbitol, inositol, dulcitol, ne répondent pas aux caractères généraux de l'espèce *Xanthomonas campestris pv. citri*.

TABLEAU 6 - Relations antigéniques.

Sérums	JA 143	JA 151-1	JA 151-5	JA 151-8	JB 3-6	JB 3-7	JB 3-8	Types de chancres
Souches								
JB 3-7	++	+	++	++	-	++	-	A
JA 143	}	++	++	++	-	++ ou -	-	A ?
JA 151-1								
JA 151-5								
JA 151-8								
JA 159-1								
JA 3-1								
JB 50-10b	}	/	/	/	-	+	-	A ?
JB 53-1b								
JB 3-8	-	-	-	-	-	-	++	B
JB 3-6	++	++	++	++	++	++	-	C
JA 162-5	}	++	++	++	+	+	-	C ?
JA 163-4								
JA 163-5								
JB 3-2								
JB 3-5								
JB 50-10a	++	/	/	/	++	+	-	C ?
JB 50-1a	++	/	/	/	+	-	-	C ?
JA 163-2	}	++	++	++	-	-	-	?
JA 167-2								
JB 3-3	}	-	-	-	-	-	-	?
JB 3-4								
JB 50-2a	}	/	/	/	-	-	-	?
JB 50-8a								
JB 50-8b								
JB 53-1a								
JB 53-1d								
JB 53-1f								
JB 53-1g								
JB 53-21a								
JB 53-22a								
JB 53-22c								
JB 53-31b								

++ sérum dilué au 1/12800 ou 1/6400

+ sérum dilué au 1/3200 ou 1/1600

- dilution du sérum inférieure à 1/800

Les autres souches sont proches soit de la souche référence du chancre A, soit de celle du chancre C ; mais en aucun cas on ne trouve de souches apparentées à la souche de référence du chancre B.

Relations antigéniques.

Le titre des sérums anti JA 143, anti JA 151-1, anti JA 151-5, anti JB 3-7 et anti JB 3-8 est de 12 800. Celui des sérums anti JA 151-8 et anti JB 3-6 est de 6.400 (tableau 6).

En se basant sur les résultats de la sérologie nous pouvons confirmer qu'aucune souche isolée de la Réunion n'est apparentée à la souche référence JB 3-8 du chancre B.

Aucune souche ne réagit fortement avec le sérum anti JB 3-8. La réaction antigène-anticorps ne se produit qu'avec les dilutions à 1/10, 1/100, 1/200 du sérum.

Malgré quelques difficultés d'interprétation pour les souches JA 163-2, JA 167-2, JB 3-3, JB 3-4, JB 50-2a à JB 53-31 b, les souches de *Xanthomonas citri* isolées de la Réunion sont sérologiquement proches mais non identiques aux souches références des chancres A ou C.

En outre, le fait que la souche JB 3-6 (chancre C) réagisse avec le sérum anti JB 3-7 laisse supposer qu'il existe au moins un motif antigénique commun aux deux souches.

Cependant aucune réaction ne se produit entre JB 3-7 et le sérum anti JB 3-6.

JB 3-7 posséderait donc en plus de ses motifs antigéniques propres, des motifs antigéniques communs avec JB 3-6.

Utilisation des bactériophages.

Les résultats de la sensibilité aux bactériophages XC1, XC3, XC4, XC5, Cp1, Cp2 et Cp3, figurent au tableau 7.

Seule la souche JB 3-5 est sensible aux bactériophages XC1, XC4 et XC5.

Aucune des souches n'est lysée par le bactériophage XC3. Même la souche réceptrice JA 151-1, qui a servi à la multiplication du bactériophage, est résistante. La suspension phagique ne contenait peut-être plus de bactériophage vivant.

Certaines souches sont sensibles au bactériophage Cp1 seul (JB 3-7), au bactériophage Cp2 seul (JA 143, JA 151-5 et JA 151-8) ; d'autres le sont aux deux (JA 159-1, JA 162-5, JB 3-5).

Enfin, seule, la souche JB 3-8 est lysée par le bactériophage Cp3.

TABLEAU 7 - Comparaison pour la sensibilité aux bactériophages des souches de la Réunion et des souches de références JB 3-7 (chancre A), JB 3-8 (chancre B) et JB 3-6 (chancre C).

Souches	Phages						Types de chancres	
	XC1	XC4	XC5	XC3	Cp1	Cp2		Cp3
JB 3-7	-	-	-	-	+	-	-	A
JA 143	}	-	-	-	-	+	-	A ?
JA 151-5								
JA 151-8								
JA 159-1	}	-	-	-	+	+	-	A ?
JA 162-5								
JB 3-5		+	-	-	+	+	-	A ?
JB 3-8		-	-	-	-	-	+	B
JB 3-6		-	-	-	-	-	-	C
JA 151-1	}	-	-	-	-	-	-	A ou C
JA 163-2								
JA 163-4								
JA 163-5								
JB 3-1								
JB 3-2								
JB 3-3								
JB 3-4								

Aucune des souches isolées de la Réunion n'est lysée par le bactériophage Cp₃. Celui-ci est considéré actuellement comme étant un bactériophage spécifique du chancre B.

Aucune des souches isolées de la Réunion n'est lysée par le seul bactériophage Cp₁. Cependant, les bactériophages Cp₁ et Cp₂ sont, selon GOTO (1980), spécifiques du chancre A.

Les souches JA 143, JA 151-5, JA 151-8, JA 159-1, JA 162-5 et JB 3-5, bien que différentes de la souche référence JB 3-7, sont probablement proches du chancre A.

La souche référence JB 3-6 du chancre C n'est lysée par aucun des bactériophages. Il en est de même pour les souches JA 151-1, JA 163-2, JA 163-4, JA 163-5, JB 3-1, JB 3-2, JB 3-3 et JB 3-4.

Nous ne pouvons cependant pas les apparenter avec certitude au chancre C, GOTO (1980) ayant signalé une souche du chancre A résistante aux bactériophages Cp₁, Cp₂ et Cp₃.

Antibiogrammes.

Le diamètre des zones d'inhibition est fonction de la sensibilité du germe et permet une détermination de l'efficacité de l'antibiotique. Pour la lecture des antibiogrammes, nous avons choisi une interprétation binaire (BIO-MERIEUX)

- diamètre de la zone d'inhibition inférieur ou égal au diamètre critique : résistant ;
 - diamètre de la zone d'inhibition supérieur au diamètre critique : sensible.
- (tableau 8).

Les souches du pv. *citri* se différencient facilement des autres souches isolées de *Citrus* par leur sensibilité à la gentamicine et à l'acide nalidixique en particulier. Elles sont par contre toutes résistantes à la céfalotine (antibiotique entrant dans la composition du milieu sélectif).

Sur la base de ces antibiogrammes, nous pouvons rapprocher les souches JA 151-1, JA 151-8, JA 162-5, JA 167-2, JB 3-1, JB 3-2 et JB 93-7 de la souche référence du chancre C (JB 3-6). Nous pouvons par ailleurs regrouper les souches JA 143 [considérée comme proche de la souche référence du chancre A (JB 3-7)], JA 151-5, JA 159-1, JA 163-4, JA 163-5, JB 50-10b, JB 53-1 et JB 93-1.

Si la souche référence du chancre A (JB 3-7) ne présente qu'une différence (céfotaxime -) avec celle du chancre C (JB 3-6) (céfotaxime +), il n'en est pas de même pour la souche référence du chancre B (JB 3-8) qui possède un antibiogramme bien particulier.

Analyse de plasmides.

Malgré les nombreuses difficultés rencontrées lors de cette étude, nous avons pu mettre en évidence la présence d'un ou plusieurs plasmides dans 15 souches du pv. *citri* et 5 souches isolées de *Citrus* de la Réunion.

L'utilisation de 2 souches de références (*Xanthomonas corylina* rp₄ et *Erwinia herbicola* rp₄) ayant des plasmides de poids moléculaires connus, a permis l'évaluation du poids moléculaire des plasmides rencontrés. La mobilité relative d'une plasmide dans un gel d'agarose est fonction de son poids moléculaire et le report de cette valeur sur une courbe étalon permet de connaître ce poids (figure 1).

La comparaison des plasmides des souches isolées de *Citrus* de la Réunion nous conduit aux interprétations suivantes :

- les souches JA 143, JA 151-1, JA 162-5, JA 163-4, JC-27-1 et JC 27-2, possèdent un plasmide semblable à celui de la souche JB 3-7 (référence du chancre A). Ces plasmides ont un poids moléculaire proche du plasmide rp₄ ;
- les souches JA 151-5, JA 163-5, JA 167-2, JB-93-7 et JA 143 rif₂, possèdent un ou deux plasmides proches de ceux de la souche JB 3-6 (référence du chancre C).

On constatera que cette «classification» est, excepté pour les souches JA 167-2 et JB 93-7, différente de celle proposée par l'analyse des antibiogrammes. Cette remarque ne peut que mieux nous faire comprendre la grande variabilité de la population du pv. *citri* à la Réunion ... ou les limites d'une classification trop simpliste en chancres A, B et C !!!

Obtention des souches résistantes aux antibiotiques.

Deux souches résistantes à la rifamycine (JA 143 rif₁ et JA 143 rif₂) et deux souches résistantes à la streptomycine (JA 143 str₁ et JA 143 str₂) ont été isolées 4 et 8 jours respectivement après ensemencement. Aucune colonie ne s'est développée sur le milieu gélosé contenant de la kanamycine ou de la novobiocine comme antibiotique.

La souche JA 143 str₁ a été utilisée lors de l'étude du comportement épiphyllé de *Xanthomonas citri* sur agrumes. Les souches JA 143 str₂ et JA 143 rif₂ ont été utilisées dans l'étude du pouvoir pathogène. La souche JA 143 rif₂ a fait l'objet d'une analyse de plasmides.

Toutes ces souches sont au moins résistantes à 50 ppm d'antibiotique. C'est cette concentration qui est utilisée pour la préparation des milieux de numération dans l'étude du comportement épiphyllé du pv. *citri* sur agrumes.

L'obtention de résistants au laboratoire laisse supposer qu'un tel phénomène n'est pas improbable dans la nature et montre les limites des possibilités d'utilisation des anti-

TABLEAU 8 - Antibiogrammes.

Souche	Antibiotique																		
	Carbénicilline	Céfalotine	Céfaroxime	Céfamandole	Céfotaxime	Streptomycine	Kanamycine	Gentamicine	Sisomicine	Oxytétracycline	Erythromycine	Clindamycine	Chloramphénicol	Rifampicine	Acide nalidixique	Fluméquine	Triméthoprim-Sulfamides	Novobiocine	Fosfomycine
JA 143*	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
JA 151-1 *	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
JA 151-5 *	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
JA 151-8 *	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
JA 159-1 *	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
JA 162-5 *	+	+	+	+	+	/	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
JA 163-4 *	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
JA 163-5 *	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
JA 167-2 *	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
JB 3-1 *	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
JB 3-2 *	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
JB 3-3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
JB 3-4	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
JB 3-5 *	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
JB 3-6 *	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
JB 3-7 *	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
JB 3-8 *	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
JB 50-1 *	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
JB 50-8	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
JB 50-10a *	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JB 50-10b *	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
JB 53-1 *	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
JB 53-21	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
JB 93-1 *	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
JB 93-4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
JB 93-7 *	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
JB 93-9	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
JC 7	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
JC 13-1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
JC 13-2	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
JC 13-3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
JC 13-4	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
JC 13-5	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
JC 13-6	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
JC 13-7	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-

+ résistant - sensible * *Xanthomonas citri*.

biotiques dans la lutte contre les maladies bactériennes.

Etude du comportement épiphyllé de Xanthomonas citri sur agrumes.

Le résultat des prélèvements effectués sur tangelo Orlando et *P. trifoliata* est représenté par les figures 2 et 3.

Les courbes d'évolution des populations montrent une diminution rapide de la quantité de bactéries viables (comptage étalement, comptage empreinte) à la surface des

feuilles. On constate cependant une augmentation de la population bactérienne sur tangelo Orlando entre le 4e et le 8e jour après inoculation.

La numération par la technique d'immunofluorescence donne des valeurs pratiquement constantes car cette technique ne tient pas compte de la viabilité des cellules. Elle ne présente donc que peu d'intérêt dans l'étude sous serre de l'évolution d'une population, où l'absence de pluie de lessivage en particulier ne permet pas l'élimination des déchets (bactéries mortes).

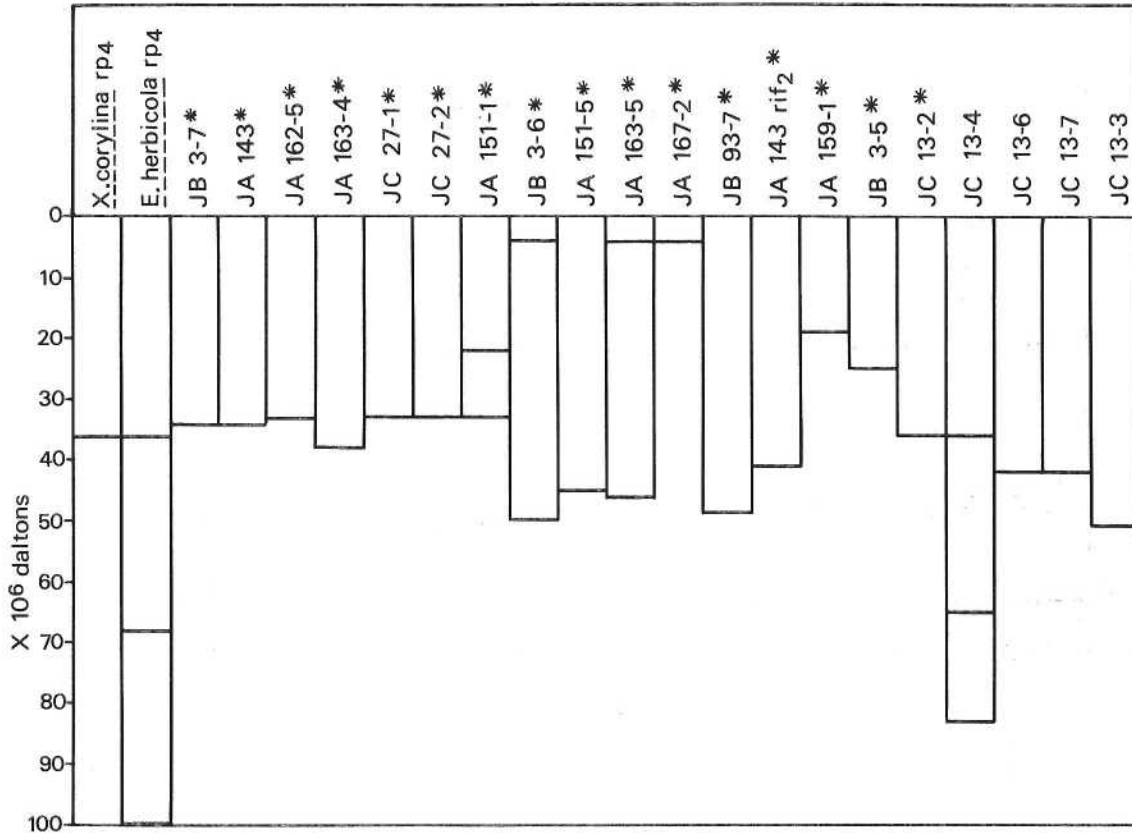


Figure 1 • COMPARAISON DES PLASMIDES DES SOUCHES ISOLEES DE CITRUS DE LA REUNION. (* = *Xanthomonas citri*).

Nous signalerons enfin que deux mois après l'inoculation aucun symptôme n'était apparu. Tout ceci laisse supposer que, d'une part *pv. citri* est incapable de survivre d'une façon prolongée «en saprophyte» à la surface des feuilles et que, d'autre part la pénétration de la bactérie (donc le développement de la maladie) ne peut se faire qu'au niveau de zones blessées. Il serait souhaitable pour conforter cette hypothèse de réaliser la même expérience en blessant préalablement les feuilles (sable, carborandum).

Le non-maintien de la bactérie sur les feuilles est une donnée intéressante pour les études épidémiologiques qu'il serait nécessaire d'entreprendre à la Réunion, et dont il faudra tenir compte dans l'établissement des programmes de lutte.

Etude du pouvoir pathogène.

● Notation.

Le système de notation choisi a pour but d'apprécier la vitesse d'apparition des symptômes (notation 28, 37 et 65 jours après inoculation) et la fréquence de l'infection.

Chaque inoculation est notée + ou - selon l'apparition ou non de pustules caractéristiques. On obtient ainsi la probabilité de réussite de l'inoculation au niveau d'une feuille (10 piqûres) et on calcule la moyenne sur les 5 feuilles. La valeur de *p* obtenue est transformée en degrés ($y = \text{Arcsin} \sqrt{p}$) pour permettre l'analyse statistique.

Des problèmes d'ordre physiologique (perte des feuilles, mauvaise croissance) et d'ordre parasitaire (acariens), ont perturbé l'expérimentation sur les espèces *P. trifoliata* et *C. aurantifolia* ; l'étude du pouvoir pathogène et l'analyse mathématique ne portent donc que sur les espèces tangelo Orlando, *C. sinensis* var. Madame Vinous et *C. volkame-riana* (tableau 9). Les souches JB 3-3, JB 3-4, JB 50-8, JB 53-21, JC 7, JC 13-3, JC 13-4 et JC 26-2 ne sont pas pathogènes sur agrumes ; ce qui confirme leur non-appartenance au *pv. citri*.

● Analyse des résultats.

Une analyse de variance montre qu'il existe une différence significative de sensibilité des espèces de *Citrus* et de virulence des souches du *pv. citri* (tableau 10) 28, 37 et 65 jours après inoculation.

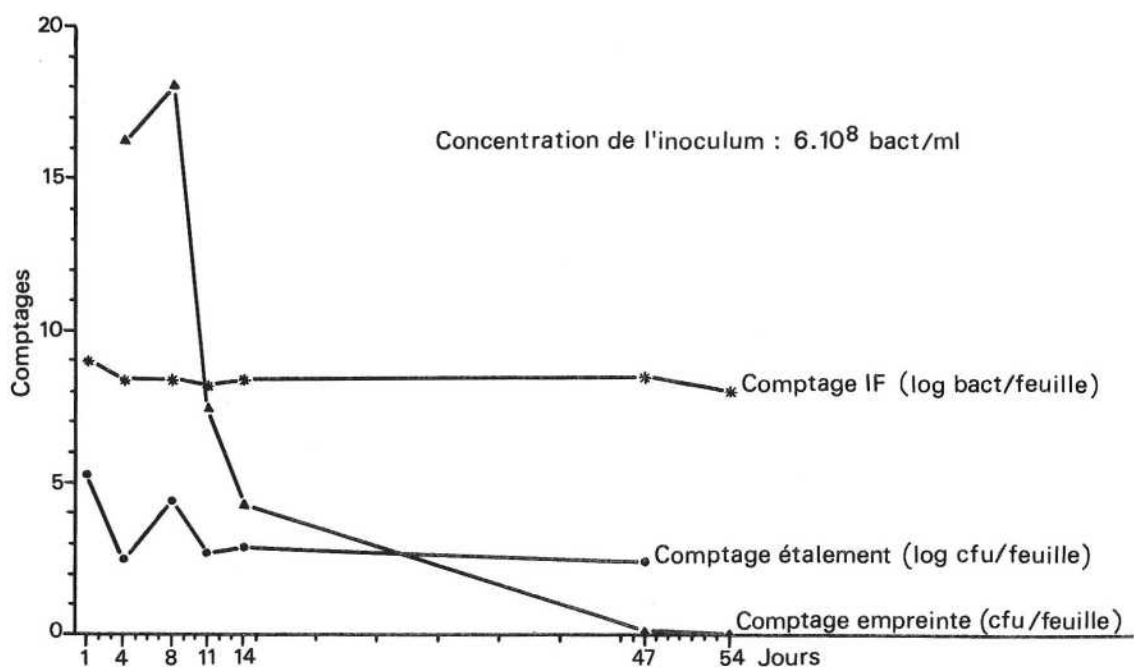


Figure 2 • EVOLUTION D'UNE POPULATION DE XANTHOMONAS CITRI (SOUCHE JA 143 str₁) APRES PULVERISATION SUR TANGELO ORLANDO.

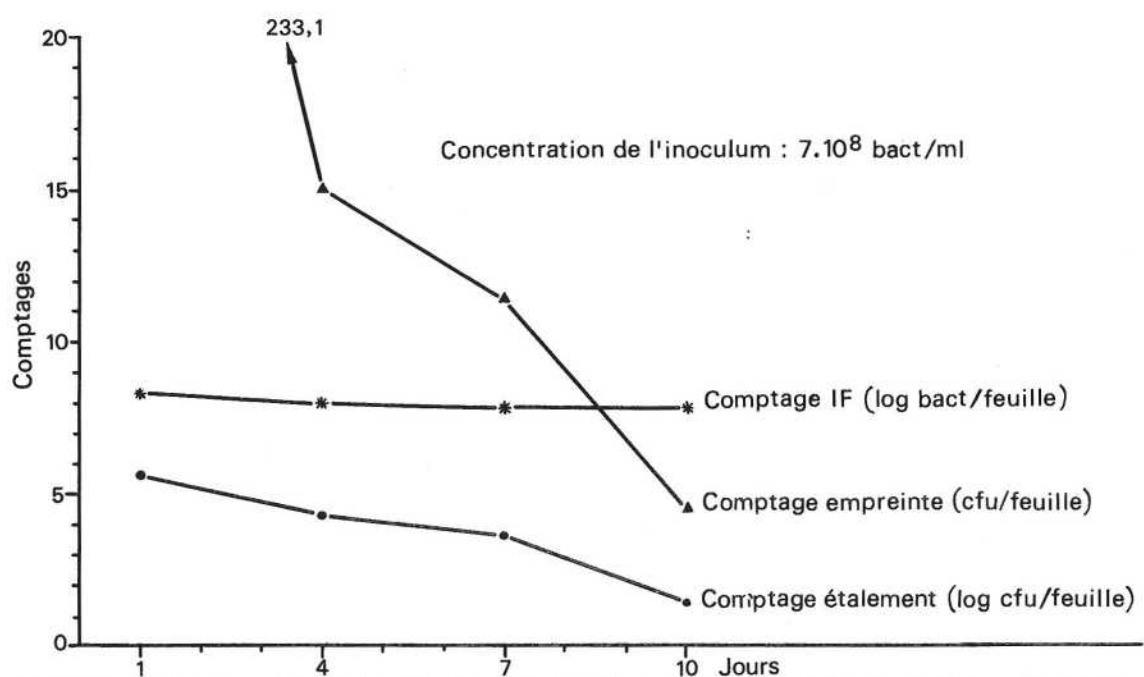


Figure 3 • EVOLUTION D'UNE POPULATION DE XANTHOMONAS CITRI (SOUCHE JA 143 str₁) APRES PULVERISATION SUR PONCIRUS TRIFOLIATA.

TABLEAU 9 - Variation de la réponse de trois espèces d'agrumes à l'inoculation de différentes souches de *Xanthomonas citri*.

Souche	Jours après inoculation	Tangelo Orlando	<i>Citrus sinensis</i> var. Madame Vinous	<i>Citrus volkameriana</i>
JA 143*	28	43,38	54,47	66,01
	37	65,85	69,54	46,75
	65	61,62	64,16	57,69
JA 151-1*		69,52	86,31	65,96
		86,31	86,31	82,15
		90,00	90,00	84,69
JA 151-5*		14,31	56,25	90,00
		90,00	83,86	82,63
		90,00	90,00	90,00
JA 151-8*		60,52	71,83	65,47
		75,69	86,31	73,55
		75,99	82,63	81,70
JA 162-5*		69,05	72,00	90,00
		82,63	82,63	86,31
		78,94	90,00	90,00
JA 163-2*		86,31	82,15	75,69
		90,00	90,00	81,00
		90,00	90,00	82,63
JA 163-4*		53,09	80,79	90,00
		78,75	90,00	81,70
		84,69	90,00	84,69
JA 167-2*		77,31	76,16	56,96
		86,31	83,36	86,31
		90,00	90,00	67,28
JB 3-1*		56,25	78,75	90,00
		83,36	82,63	90,00
		83,36	86,31	90,00
JB 3-2*		50,32	78,47	82,63
		83,36	86,31	70,38
		90,00	86,31	72,00
JB 3-5*		53,27	70,38	74,78
		75,69	78,94	77,32
		80,19	78,94	82,63
JB 3-6*		61,67	74,36	78,47
		65,36	82,63	84,69
		69,64	86,31	83,36
JB 3-7*		61,67	84,69	79,67
		90,00	90,00	82,63
		90,00	90,00	82,63
JB 3-8*		9,00	23,11	0,00
		73,16	65,31	37,89
		77,32	74,31	59,32
JB 50-1*		90,00	86,31	90,00
		90,00	90,00	90,00
		90,00	90,00	90,00
JB 50-10a*		5,31	78,47	24,64
		30,99	79,67	60,52
		53,83	86,31	77,09

Souche	Tangelo Orlando	<i>Citrus sinensis</i> var. Madame Vinous	<i>Citrus volkameriana</i>
JB 50-10 b*	83,36	78,47	90,00
	90,00	86,31	82,63
	90,00	86,31	90,00
JB 93-1*	83,36	81,70	90,00
	84,69	90,00	90,00
	90,00	90,00	90,00
JB 93-3*	72,00	86,31	84,69
	90,00	90,00	81,00
	90,00	90,00	81,00
JB 93-7*	73,03	83,36	74,36
	90,00	84,69	78,47
	86,31	84,69	83,36
JC 27-1*	70,39	90,00	90,00
	81,00	90,00	90,00
	79,38	90,00	90,00
JA 143 rif2*	22,16	34,80	0,00
	56,83	62,88	21,69
	54,81	65,83	29,36
JA 143 str2*	45,42	48,51	23,32
	64,56	64,03	50,44
	73,15	65,66	58,84

Les pourcentages de réponses sont transformés en $y = \text{Arc sin} \sqrt{p}$.

● Sensibilité des espèces.

L'analyse des résultats par le test des ranges de Duncan (tableau 11) indique que les espèces *C. sinensis* var. Madame Vinous et *C. volkameriana* sont plus sensibles à l'infection par le pv. *citri* que l'espèce tangelo Orlando (test signification à 5 p. 100 28 jours après inoculation).

Cependant, 37 et 65 jours après inoculation, on constate que : la sensibilité du *C. sinensis* var. Madame Vinous n'est pas significativement différente de celle du tangelo Orlando ; la sensibilité du tangelo Orlando n'est pas significativement différente de celle du *C. volkameriana* ; le *C. sinensis* var. Madame Vinous est par contre significativement plus sensible que le *C. volkameriana*.

TABLEAU 10 - Analyse de variance.

Origine de la fluctuation	Somme des carrés des écarts	Nombre de d.d.l.	Variance	F
Notation 28 jours après inoculation :				
souches	29 252,83	22	1 329,67	6,87 **
variétés	2 843,73	2	1 421,86	7,35 **
résiduelle	8 516,81	44	193,56	
total	40 613,37	68		
Notation 37 jours après inoculation :				
souches	10 095,66	22	458,89	5,80 **
variétés	763,28	2	381,64	4,83 *
résiduelle	3 479,17	44	79,07	
total	14 338,11	68		
Notation 65 jours après inoculation :				
souches	7 167,01	22	325,77	6,47 **
variétés	425,29	2	212,64	4,22 *
résiduelle	2.216,84	44	50,38	
total	9 809,14	68		

* - significatif à 5 p. 100

** - significatif à 1 p. 100

TABLEAU 11 - Test des rangs de Duncan sur trois espèces de *Citrus*.

	<i>Citrus sinensis</i> var. Madame Vinous	Tangelo Orlando	<i>Citrus volkameriana</i>
28 jours après inoculation			
sensibilité			
moyenne	72,07	56,99	68,38
r			
9,92	62,15	S	NS
8,24		S	60,14
37 jours après inoculation			
sensibilité			
moyenne	82,41	78,46	74,26
r			
6,33	76,08	NS	S
5,25		73,21	NS
65 jours après inoculation			
sensibilité			
moyenne	84,25	80,84	78,19
r			
5,06	79,19	NS	S
4,20		76,64	NS

S : significatif au seuil 5 p. 100 NS : non significatif au seuil 5 p. 100

Une analyse plus détaillée des valeurs (tableau 9 - 65 jours) indique bien que le *C. sinensis* var. Madame Vinous se classe comme plus sensible que le tangelo Orlando et le *C. volkameriana* ; ce dernier étant plus résistant que le tangelo Orlando.

● Pouvoir pathogène des souches.

Une analyse similaire des résultats d'inoculations montre qu'il n'existe pas de différence significative (méthode des rangs de Duncan) entre les souches sauf pour JA 143, JA 143 str₂ et JA 143 rif₂ que l'on peut regrouper et séparer des précédentes. Cependant, 3 souches (JA 151-5, JB 50-1, JB 93-1) se développent efficacement ($p = 1$) sur les trois espèces de *Citrus* considérées. Par contre, les souches JA 143, JA 143 str₂, JA 143 rif₂, JB 3-8 (chancre B) et JB 50-10a, ont un pouvoir pathogène réduit sur ces mêmes espèces (p moy. = 0,78). Les souches JA 167-2 et JB 3-2 sont plus agressives sur tangelo Orlando et *C. sinensis* var. Madame Vinous que sur *C. volkameriana*. Les souches JA 162-5, JB 3-6 (chancre C) et JC 27-1 sont, elles, plus agressives sur *C. sinensis* var. Madame Vinous et *C. volkameriana* que sur tangelo Orlando.

Ces résultats expérimentaux montrent une fois encore la grande variabilité de la population du pv. *citri* à la Réunion, et ne facilite pas la classification des espèces de *Citrus* en fonction de leur sensibilité ; et par la même occasion, le travail de sélectionneur dans la recherche de variétés résistantes (ou moins sensibles) - une espèce résistante à une souche pouvant se montrer sensible lors du criblage par une autre souche.

● Réisolement et caractérisation.

Pour établir le principe de KOCH, après isolement et inoculation, nous avons réisolé les bactéries à partir des symptômes sur feuilles de tangelo Orlando.

La caractérisation des bactéries par les tests classiques de détermination les situe dans le genre *Xanthomonas* (esculine +, cytochrome C oxydase -, réduction nitrates en nitrites -, hydrolyse de l'amidon +, Hugh et Leifson oxydatif, hypersensibilité sur tabac +). De plus, l'utilisation de la sérologie (tableau 12) montre que, seule, l'eau de broyage des feuilles inoculées avec la souche JB 3-8 (chancre B) présente une fluorescence avec le sérum JB 3-8. Ceci conforte les premiers travaux selon lesquels aucune souche de la Réunion ne s'apparente à la souche référence du chancre B. Les autres souches réagissent seulement avec les sérums JA 143 et JB 3-7 (chancre A).

Enfin, les souches JB 3-3, JB 3-4, JB 50-8, JB 53-21, JC 7, JC 13-3, JC 13-4 et JC 26-2, se révèlent non pathogènes sur tangelo Orlando (mais aussi sur *C. sinensis* var. Madame Vinous et *C. volkameriana*), ce qui conforte nos résultats antérieurs.

Le comptage indique le niveau des populations dans les feuilles inoculées. La comparaison avec les valeurs du pouvoir pathogène des souches (tableau 9) montre que les souches les plus agressives sur tangelo Orlando se sont fortement multipliées dans les feuilles (10^6 à 10^8 cfu/feuille) ; les moins agressives présentent par contre un niveau de population plus faible (10^2 à 10^5 cfu/feuille).

TABLEAU 12 - Relations sérologiques et comptages des populations.

souche	pathogène sur Tangelo Orlando	sérum			comptage étalement log cfu/feuille
		JA 143 log bact/feuille	JB 3-7 log bact/feuille	JB 3-8 log bact/feuille	
JA 143	+	7,3	6,9	-	5,5
JA 151-1	+	7,8	7,9	-	7,8
JA 151-5	+	8,6	8,2	-	6,6
JA 151-8	+	7,0	7,4	-	6,4
JA 162-5	+	7,4	7,9	-	6,5
JA 163-2	+	8,1	8,4	-	6,9
JA 163-4	+	7,9	8,2	-	7,5
JA 167-2	+	7,7	8,3	-	5,5
JB 3-1	+	8,3	8,1	-	7,7
JB 3-2	+	8,0	7,8	-	5,5
JB 3-3	-	0	0	0	0
JB 3-4	-	0	0	0	0
JB 3-5	+	8,5	7,9	-	7,4
JB 3-6	+	7,7	7,9	-	7,5
JB 3-7	+	7,9	7,9	-	7,8
JB 3-8	+	-	-	7,3	4,5
JB 50-1	+	7,8	8,0	-	4,8
JB 50-8	-	0	0	0	0
JB 50-10 a	+	5,6	6,9	-	4,0
JB 50-10b	+	8,2	8,4	-	7,1
JB 53-1	+	5,6	5,3	-	5,1
JB 53-21	-	0	0	0	0
JB 93-1	+	8,2	7,9	-	7,1
JB 93-3	+	7,0	7,8	-	6,2
JB 93-7	+	7,9	7,5	-	6,8
JC 7	±	5,6	0	-	0
JC 13-3	-	0	0	0	0
JC 13-4	-	0	0	0	0
JC 26-2	-	0	0	0	0
JC 27-1	+	0	7,4	-	7,6
JA 143 rif ₂	+	6,6	7,0	-	2,5
JA 143 str ₂	+	0	6,8	-	6,0

broyage des feuilles de tangelo Orlando 66 jours après inoculation par piqûres (2.10^8 bact/ml).

CONCLUSION

L'ensemble de ces résultats donne un aperçu de la variabilité des populations pathogènes du *pv. citri* dans l'île de la Réunion. Cette variabilité s'exprime déjà par des différences des caractéristiques physiologiques, biochimiques, sérologiques et lysotypiques des souches. La sensibilité des souches aux antibiotiques n'apporte aucune information supplémentaire mais confirme la différence des souches de la Réunion avec la souche référence du chancre B. Le début d'analyse génétique indique la présence de plasmides ; ceux-ci n'étant apparemment d'aucune utilité pour séparer les différents types de chancres. Enfin, l'étude

du pouvoir pathogène n'a pas mis en évidence un spectre d'hôtes différent selon les souches et le type de chancre. Tous ces éléments montrent que la classification des souches en chancres A, B et C, n'est pas simple et militent en faveur d'un sérieux réexamen.

Au plan biologique, on constate que *X. c. pv. citri* n'est capable de survivre que temporairement sur l'arbre (au moins dans nos conditions d'expérimentations) ; de plus, la réalisation de son cycle d'infection semble nécessiter la présence de blessures. Cette étude à peine esquissée devrait être poursuivie pour mieux comprendre le développement de la maladie en fonction des conditions d'environnement afin d'aboutir à terme à une lutte raisonnée et efficace.

BIBLIOGRAPHIE

- ALCARAZ (F.) de. 1980.
Relación entre el desarrollo del tejido foliar cítrico y la predisposición a *Xanthomonas citri* (HASSE) DOW.
Fitopatología, 15 (1), 63-66.
- AUBERT (B.) et PARCEVAUX (S.) de. 1969.
Résistance à la diffusion gazeuse au niveau de l'épiderme foliaire de quelques plantes fruitières tropicales et subtropicales.
Fruits, 24 (4), 177-190.
- AUBERT (B.), LUISETTI (J.), CIVEROLO (E.L.), CADET (Th.) et LAVILLE (E.). 1982.
Le chancre citrique à l'île de la Réunion.
Fruits, 37 (11), 705-722.
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 1974.
The Williams and Wilkins Company, Eighth edition, Baltimore, 244-246.
- BIO MERIEUX. 1980.
Bactériologie.
Charbonnières-les-Bains, 66-67.
- BLONDEL (L.). 1978.
Classification botanique des espèces du genre *Citrus*.
Fruits, 33 (11), 695-720.
- BRUN (J.). 1971.
Le chancre bactérien des *Citrus*.
Fruits, 26 (7-8), 533-540.
- BULLETIN EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. 1979.
Xanthomonas citri (C. HASSE) DOWSON.
vol. 9 (2).
- CALAVAN (E.C.). 1956.
Citrus canker. A bacterial disease caused by *Xanthomonas citri*.
Calif. State Dept. Agr. Bull. 45, 4, 259-262.
- CIVEROLO (E.L.). 1982.
Comparative evaluation of provisional strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* from Reunion Island.
Rapport de recherche, 20 p.
- DYE (D.W.), BRADBURY (J.F.), GOTO (M.), HAYWARD (A.C.), LELLIOTT (R.A.) et SCHROTH (M.N.). 1980.
International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains.
Review of plant pathology, 59 (4).
- ECKHARDT (T.). 1978.
A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria.
Plasmid, 1, 584-588.
- FAWCETT (H.S.). 1936.
Citrus diseases and their control.
Mc Graw-Hill Book Company Inc. New-York and London, 237-249.
- GARDAN (L.) et LUISETTI (J.).
Méthodes d'isolement et d'identification des bactéries phytopathogènes.
INRA Angers.
- GOTO (M.). 1976.
Selective population changes of *Xanthomonas citri* (HASSE) DOWSON in diseased tissues.
Ann. Phytopath. Soc. Japan, 42, 174-180.
- GOTO (M.), TAKAHASHI (T.), MESSINA (M.A.). 1980.
A comparative study of the strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* isolated from *Citrus* canker in Japan and canker in Argentina.
Ann. Phytopath. Soc. Japan, 46, 329-338.
- JEHLE (R.A.). 1918.
Susceptibility of *Xanthoxylum clava-hercules* to *Bacterium citri*.
Phytopathology, 8, 34-35.
- KADO (C.I.) et LIU (S.T.). 1981.
Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids.
Journal of Bacteriology, 145 (3), 1365-1373.
- KOISUMI (M.). 1971.
A quantitative determination method for *Xanthomonas citri* by inoculation into detached *Citrus* leaves.
Bull. of the hort. Res. Sta., series B, n° 11.
- KIOSUMI (M.). 1977.
Relation of temperature to the development of *Citrus* canker lesions in the spring.
Proc. Inc. Soc. Citriculture, 3, 924-928.
- KOIZUMI (M.). 1979.
Ultrastructural changes in susceptible and resistant plants of *Citrus* following artificial inoculation with *Xanthomonas citri* (HASSE) DOWSON.
Ann. Phytopath. Soc. Japan, 45 (5), 635-644.
- KUHARA (S.). 1978.
Present epidemic status and control of the *Citrus* canker disease [*Xanthomonas citri* (HASSE) DOWSON] in Japan.
Review of Plant Protection Res., 11, 132-142.
- LAVILLE (J.). 1982.
Caractérisation des souches de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (HASSE, 1915) DYE 1978 isolées de l'île de la Réunion.
Rapport de Maîtrise, Université d'Angers - INRA Angers, 30 p.
- LAVILLE (J.). 1983.
Etude de souches de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (HASSE, 1915) DYE 1978 isolées de l'île de la Réunion ; caractères bactériologiques, comportement épiphyte, pouvoir pathogène.
Rapport de Diplôme d'Etudes approfondies de Phytopathologie, Université de Paris-Sud Orsay - INRA Angers, 41 p.
- Mc LEAN (F.T.) et ATHERTON LEE (H.). 1921.
The resistance to *Citrus* canker of *Citrus nobilis* and a suggestion as to the production of resistant varieties in other *Citrus* species.
Phytopathology, 11 (3).
- MESSINA (M.A.). 1980.
Los métodos serológicos en el estudio de la bacteria que produce la cankerosis en la Argentina.
IV.- La técnica de inmunofluorescencia. Su aplicación como elemento de diagnóstico de laboratorio.
INTA-EEA concordi serie Técnica.
- MEYERS (J.A.), SANCHEZ (D.), ELWELL (L.P.) et FALKOW (S.). 1976.
Simple Agarose gel electrophoretic method for the identification and characterisation of plasmid deoxyribonucleic acid.
J. of Bacteriology, 127 (3), 1529-1537.
- MINSAVAGE (G.V.) et SCHAAD (N.W.). 1983.
Characterization of membrane proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.
Phytopathology, 73 (5), 747-755.
- PARK (M.). 1938.
Citrus canker and its control.
The tropical agriculturist.
The Agric. J. of Ceylan, vol. XC, 127-135.
- RANGASWAMI (G.), RAO (R.R.) et LAKSHMANAN (A.R.). 1959.
Studies on the control of *Citrus* canker with streptomycin.
Phytopathology, vol. 49, 224-226.
- ROSSETTI (V.). 1977.
Citrus canker in latin America : A review.
Proc. Int. Soc. Citriculture, vol. 3, 923-924.
- ROSSETTI (V.). 1981.
Identificação de cancro cítrico.
O Biológico, 47 (5), 145-153.
- SNEDECOR (W.S.) et COCHRAN (W.G.). 1971.
Méthodes statistiques.
Acta, Paris.
- STALL (R.E.), MILLER (J.W.), MARCO (G.M.) et ECHENIQUE (B.I.C.) de. 1980.

Population dynamics of *Xanthomonas citri* causing canker of *Citrus* in Argentina.
Proc. Fla. State Hort. Soc., 93, 10-14.

TREMEL (Laurence). 1983.

Contribution à l'étude du chancre bactérien des agrumes dans les conditions de l'île de la Réunion.

Rapport de DAA. ENSSAA Dijon, IRFA île de la Réunion, 83 p.

WAKIMOTO (S.). 1967.

Some characteristics of *Citrus* canker bacteria *Xanthomonas citri* (HASSE) DOWSON, and the related phages isolated from Japan.
Ann. Phytopath. Soc. Japan, 33, 301-310.



SICA - ASSO BAG

GROUPEMENT DE PRODUCTEURS
DE BANANES DE LA GUADELOUPE

N° 100.40.273

DESMARIS
B.P. 46
97100 BASSE TERRE
GUADELOUPE
Téléphone 81.05.52
Télex 919727
Téléfax 81.16.08



59, av. de la Grande Armée
75782 PARIS Cedex 16
Téléphone 500.44.45
Télex 630470 Paris
Téléfax 500.28.33