

# Etude de la variabilité biochimique et physiologique de *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, agent du chancre bactérien des agrumes.

C. VERNIERE, M. DEVAUX, O. PRUVOST, A. COUTEAU et J. LUISETTI\*

ETUDE DE LA VARIABILITE BIOCHIMIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CITRI* AGENT DU CHANCRE BACTERIEN DES AGRUMES.

C. VERNIERE, M. DEVAUX, O. PRUVOST, A. COUTEAU et J. LUISETTI.

*Fruits*, Mar.-Apr. 1991, vol. 46, n° 2, p. 153-161.

RESUME - Vingt-deux souches de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* représentatives des pathotypes A, B, C, D (Citrus canker) et E (Citrus Bacterial Spot CBS) ont été étudiées pour leurs caractéristiques biochimiques et physiologiques, ainsi que pour leur profil d'assimilation de 147 substrats carbonés. Le milieu MEVAG testé a permis de mettre en évidence le métabolisme oxydatif du glucose de façon beaucoup plus nette que le milieu d'HUGH et LEIFSON classiquement utilisé. L'hydrolyse de la gélatine, de la caséine et la tolérance au NaCl permettent de classer les souches en trois groupes. Un spectre d'assimilation homogène a été observé pour 116 substrats carbonés. Les souches de type A et CBS peuvent être séparées des types B, C, D par leur assimilation du maltose, de l'amidon et du glycogène. Les souches des pathotypes B et D possèdent des profils d'assimilation très voisins. Les souches de type C se distinguent de tous les autres types par les caractères D.  $\alpha$  alanine, et L. sérine.

Mots clés : chancre bactérien des agrumes, chancre des pépinières, variabilité, substrats carbonés.

## INTRODUCTION

Le chancre bactérien des agrumes, ou chancre citrique [appelé Citrus bacterial canker disease (CBCD) par les Anglo-saxons], est une maladie d'origine bactérienne causée par *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (HASSE, 1915), DYE, 1978 (DYE *et al.*, 1980). Ce genre affecte la majorité des espèces d'agrumes (Famille des Rutacées) ainsi que d'autres Rutacées sauvages (LEE, 1918). *X. campestris* pv. *citri* est présent dans la plupart des pays de la zone agrumicole tropicale où il occasionne des dégâts qui peuvent être très importants. Il est largement répandu en Asie à l'état endé-

mique. Il n'a pas encore été détecté dans le Bassin méditerranéen (CALAVAN, 1956 ; BRUN, 1971 ; ROSSETTI, 1977 ; CIVEROLO, 1981 ; CIVEROLO, 1984 ; KOIZUMI, 1985). Récemment, la maladie a été signalée pour la première fois dans l'archipel des Maldives où elle s'exprime par un sérieux dépérissement de la lime mexicaine (ROIS-TACHER et CIVEROLO, 1989).

Au sein de ce pathovar, on distingue plusieurs formes ou pathotypes initialement décrits en fonction de leur spectre d'hôtes et de leur origine géographique :

- le pathotype A, correspondant au chancre asiatique qui possède le spectre d'hôtes le plus large et se retrouve dans la majeure partie des pays concernés par la maladie. Il a été observé pour la première fois au Japon à la fin du 19e siècle (CIVEROLO, 1984), bien que la maladie semble originaire du subcontinent indien (FAWCETT et JENKINS, 1933).

\* - VERNIERE, PRUVOST et COUTEAU - IRFA/CIRAD, Laboratoire de Phytopathologie - B.P. 180 - 97455 SAINT PIERRE CEDEX, Ile de la Réunion.  
DEVAUX et LUISETTI - INRA - Station de Pathologie végétale, rue G. Morel - 49070 BEAUCOUZE, France.

- le pathotype B, agent du chancre sud américain est connu depuis 1923. Il est présent en Argentine, en Uruguay, et probablement au Paraguay (ROSSETTI, 1977). Il est apparu sur *Citrus limon* et affecte les citronniers. Le limettier mexicain (*Citrus aurantifolia*) exprime des symptômes après inoculation artificielle.

- le pathotype C, agent du chancre de la lime mexicaine (*Citrus aurantifolia*), qui a été découvert en 1963 au Brésil. Il semble limité à ce pays et restreint à la lime mexicaine (NAMEKATA et OLIVEIRA, 1972 ; ROSSETTI, 1977). Selon KOIZUMI (1985), cette forme serait faiblement agressive sur limettiers de Perse et de Tahiti et sur citronnier «Eureka» et citronnier de Sicile.

- le pathotype D, qui a été observé en 1981 sur lime mexicaine au Mexique. Il ne semble pas induire de symptômes sur fruits (SANCHEZ et LOAIZA, 1983 ; SANCHEZ-ANGUIANO et FELIX-CASTRO, 1984). Devant la difficulté à isoler des germes de type *Xanthomonas* et à reproduire artificiellement les symptômes de cette maladie, baptisée «Citrus Leaf Spot», un autre agent causal a été recherché. Un champignon, *Alternaria* sp., a été constamment isolé et le postulat de Koch a pu être confirmé. La plupart des souches de *Xanthomonas* isolées au Mexique sont probablement des épiphytes opportunistes (BECERRA *et al.*, 1988). Une seule souche de *X. c. pv. citri*, dont le pouvoir pathogène a été confirmé, a été isolée au Mexique (Xc 90 de E.L. Civerolo).

- le pathotype E, agent du chancre des pépinières ou «Citrus bacterial spot disease (CBSD)». Il est apparu en 1984 en Floride sur Citrumelo swingle (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi* cv. Swingle) qui semble être son hôte de loin le plus commun, bien que la maladie ait été parfois décrite sur pomelo (*Citrus paradisi*). La symptomatologie de cette maladie a été décrite de façon détaillée par SCHOULTIES *et al.* (1985). Elle se distingue par l'absence de pustules chancreuses sur les organes. La dénomination CBS sera utilisée pour ces souches dans la suite de l'article.

Cette spécificité d'hôte et l'existence d'une variabilité dans l'expression du pouvoir pathogène chez les différents pathotypes (NAMEKATA et BALLMER, 1977 ; STALL *et al.*, 1982 ; GRAHAM et GOTTWALD, 1990) rendent indispensable une caractérisation simple et rapide de chacun d'eux. Différentes techniques ont été utilisées.

La sérologie, avec l'emploi de sérums polyclonaux, permet de distinguer le type A des types B ou C, alors que les types B et C ne sont pas différenciés (NAMEKATA et OLIVEIRA, 1972 ; GOTO *et al.*, 1980 ; CIVEROLO et FAN, 1982). L'utilisation d'anticorps monoclonaux permet de rapprocher la souche Xc 90 (type D) des types B et C. Ils permettent également de différencier les souches de type CBS des autres souches de *X. c. pv. citri*. Une variabilité interne aux types B et CBS a été mise en évidence (ALVAREZ *et al.*, 1987 ; PERMAR et GOTTWALD, 1989).

Des études au niveau du génôme ont permis de confirmer une variabilité au sein du *pv. citri*. CIVEROLO (1985) sépare les types A, B et C par leur contenu plasmidique. Après clivage de l'ADN total (HARTUNG et CIVEROLO, 1987) ou après analyse du polymorphisme de la longueur de fragments de restriction (RFLP) (GABRIEL *et al.*, 1988 ; HARTUNG et CIVEROLO, 1989), il est possible de

différencier le type A des types B, C, D qui présentent entre eux une plus forte homologie. Le profil des souches de types CBS est nettement différent de celui des autres souches. Il est possible de distinguer une certaine variabilité au sein des souches du type CBS, alors que le pathotype A et les pathotypes B, C et D forment deux groupes homogènes distincts. GABRIEL *et al.* (1989) ont proposé de reclasser les souches du type A au sein de l'espèce *Xanthomonas citri* (ex. HASSE) et d'installer les souches des types B, C, D et celle du type CBS dans deux nouveaux pathovars appelés respectivement *X. campestris pv. aurantifolii* *pv. nov.* et *X. campestris pv. citrumelo* *pv. nov.* Cette proposition a été contestée par VAUTERIN *et al.* (1990) et par YOUNG *et al.* (1990).

L'analyse d'isozymes fait apparaître de nombreuses similitudes au sein du *pv. citri* (types A, B, C et D) et révèle une certaine hétérogénéité des souches de type CBS (KUBICEK *et al.*, 1989).

Au niveau biochimique et physiologique, plusieurs travaux différencient les pathotypes entre eux (GOTO *et al.*, 1980 ; LAVILLE, 1985 ; MIZUNO *et al.*, 1988) ou révèlent une variabilité intrapathotype (GOTO, 1962 ; ALCARAZ, 1977 ; ALCARAZ, 1980 ; WU *et al.*, 1986).

Le but de ce travail est de caractériser par des tests biochimiques et physiologiques simples chacun des pathotypes décrits afin d'obtenir une détermination facile à mettre en oeuvre et qui puisse révéler la variabilité inter-pathotype et intrapathotype au sein du pathovar *citri*.

## MATERIEL ET METHODES

Les souches étudiées ont été obtenues à partir de cultures lyophilisées (tableau 1). Tous les tests ont été réalisés à partir de cultures incubées à 28°C sur milieu LPGAC (extrait de levure : 7 g ; bactopectone : 7 g ; glucose : 7 g ; agar : 15 g ; eau distillée : 1000 ml ; pH 7,2 ; cycloheximide : 50 mg) et âgées de 24 heures.

Le milieu MEVAG (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 1 g ; KCl : 0,2 g ; extrait de levure : 1 g ; agar : 3 g ; glucose : 10 g ; pourpre de bromocrésol : 0,015 g ; eau distillée : 1000 ml ; pH 7,1) a été comparé au milieu de HUGH et LEIFSON (1953) pour la détermination du type métabolique. Le milieu utilisé pour étudier l'hydrolyse de la caséine contient 3,2 g/l de lait écrémé stérile et 25 g/l d'agar ; son pH est ajusté à 7,0. Les autres tests ont été réalisés comme indiqué dans le tableau 2. La réponse aux tests décrits ci-dessus et dans le tableau 2 a été notée après 14 jours d'incubation.

L'étude de l'assimilation de 147 substrats (sucres, acides organiques et acides aminés) a été effectuée à l'aide de galeries API (respectivement API 50 CH, LRA 50 AO et LRA 50 AA). Le milieu API CHE préconisé pour les bâtonnets Gram négatif, contenant environ 10<sup>6</sup> u.f.c./ml. a servi à l'ensemencement des cupules (API system, La Balme - les Grottes, 38390 MONTALIEU-VERCIEU, France). L'apparition d'un trouble a été observé après 3, 6 et 9 jours d'incubation. Deux répétitions ont été faites pour chaque combinaisons souche - substrat. Pour tous les tests, la température d'incubation retenue était de 28°C.

TABLEAU 1 - Références des souches de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* étudiées.

Numéro de souche	Pathotype	Hôte	Origine géographique	Date d'isolement	Autres numéros
CFBP <sup>a</sup> 2525 <sup>b</sup>	A	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. F.	Nouvelle Zélande	1956	NCPPB <sup>c</sup> 409
CFBP 2900	A	<i>Citrus</i> sp.	Japon	?	NCPPB 3234, Xc 62 (E.L. Civerolo)
CFBP 2865	A	<i>C. aurantifolia</i> (Chr.) Sw.	Brésil	?	NCPPB 3232, Xc 59 (E.L. Civerolo)
CFBP 2909	A	<i>C. aurantifolia</i> (Chr.) Sw.	Brésil	1982	J R 416 (J.R. Neto)
JJ 157	A	<i>C. limon</i> (L.) Burm. F.	Argentine	1981	Xc 91 (E.L. Civerolo)
CFBP 1814	A	<i>C. paradisi</i>	Ile de la Réunion	1978	
JJ 9.5	A	<i>C. limon</i> (L.) Burm. F.	Ile Maurice	1985	CC 37 (S.P. Benimadhu)
JJ 10.5	A	<i>C. aurantifolia</i> (Chr.) Sw.	Ile Rodrigues	1985	CCR 13 (S.P. Benimadhu)
CFBP 2868	B	<i>C. limon</i> (L.) Burm. F.	Argentine	?	NCPPB 3237, Xc 69 (E.L. Civerolo)
CFBP 2901	B	<i>C. limon</i> (L.) Burm. F.	Argentine	?	Xc 64 (E.L. Civerolo)
CFBP 2902	B	<i>C. limon</i> (L.) Burm. F.	Argentine	?	Xc 93 (E.L. Civerolo)
CFBP 2903	B	<i>C. limon</i> (L.) Burm. F.	Argentine	?	Xc 94 (E.L. Civerolo)
CFBP 2904	B	<i>C. limon</i> (L.) Burm. F.	Argentine	?	Xc 96 (E.L. Civerolo)
JJ 159	B	<i>C. limon</i> (L.) Burm. F.	Argentine	?	Xc 148 (E.L. Civerolo)
JJ 160	B	<i>C. limon</i> (L.) Burm. F.	Argentine	?	Xc 80 (E.L. Civerolo)
JJ 161	B	<i>C. limon</i> (L.) Burm. F.	Argentine	?	Xc 84 (E.L. Civerolo)
CFBP 2866	C	<i>C. aurantifolia</i> (Chr.) Sw.	Brésil	?	NCPPB 3233, Xc 70 (E.L. Civerolo)
CFBP 2905	C	<i>C. aurantifolia</i> (Chr.) Sw.	Brésil	1981	JR 380 (J.R. Neto)
CFBP 2906	C	<i>C. aurantifolia</i> (Chr.) Sw.	Brésil	1981	PDDCC <sup>d</sup> 2432, JR 381 (J.R. Neto)
JJ 164	D	<i>C. aurantifolia</i> (Chr.) Sw.	Mexique	?	Xc 90 (E.L. Civerolo)
CFBP 2910	E <sup>e</sup>	Citrumelo	USA (Floride)	1984	F6 (E.L. Civerolo)
CFBP 3238	E	Citrumelo	USA (Floride)	1984	F1 (E.L. Civerolo)

a : CFBP : Collection Française de Bactéries Phytopathogènes - INRA - Station de Pathologie Végétale - 49070 BEAUCOUZE (France)

b : Souche de référence internationale.

c : NCPPB : National Collection of Plant Pathogenic Bacteria - Plant Pathology Laboratory, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food - HARPENDEN - Hertfordshire - U.K.

d : PDDCC : Culture Collection of Plant Diseases Division - DSIR Mt Albert Research Center, Private Bag - AUCKLAND - New Zealand.

e : Souche induisant le «Citrus Bacterial Spot Disease» (CBSD).

## RESULTATS

Dix-sept souches sur les 21 isolats étudiés ont exprimé leur métabolisme oxydatif en moins de 7 jours sur le milieu MEVAG. Il est alors possible d'observer un virage net de l'indicateur coloré dont la teinte passe de mauve à jaune (qui indique une acidification du milieu) pour le tube placé en conditions d'aérobiose. L'oxydation du glucose à partir du milieu d'HUGH et LEIFSON s'avère très difficile à observer pour *X. c.* pv. *citri* (même après trois semaines d'incubation). Un virage net de l'indicateur coloré en aérobiose a également été observé avec le milieu MEVAG mais pas avec le milieu d'HUGH et LEIFSON pour les souches type de *Xanthomonas campestris* pvs. *begoniae*, *campestris*, *corylina*, *juglandis*, *malvacearum*, *mangiferaeindicae*, *manihotis*, *oryzae*, *pelargonii*, et *vesicatoria*. Le milieu MEVAG est donc à préférer au milieu d'HUGH et LEIFSON, classiquement utilisé pour étudier le métabolisme du glucose des *Xanthomonas*.

Les réponses aux différents tests biochimiques et physiologiques montrent clairement qu'il existe une variabilité

entre les différents pathotypes (tableau 2). L'hydrolyse de la gélatine, l'hydrolyse de la caséine, la croissance en présence de NaCl permettent de classer simplement les souches en trois profils biochimiques différents :

- le premier groupe est formé par les souches de pathotype A et celles de type CBS. Ces souches hydrolysent la gélatine et la caséine, et peuvent pousser en présence de NaCl à 2 p. 100.

- le second groupe est constitué des souches du pathotype B et de la souche de type D (Xc 90) qui se comporte de façon identique. Ces souches n'hydrolysent pas la gélatine et la caséine, et leur croissance est inhibée par une concentration de NaCl de 1 p. 100.

- le troisième groupe comprend les souches de type C, qui peuvent hydrolyser la caséine, mais pas la gélatine, et qui peuvent pousser en présence de 1 p. 100 de NaCl. Une concentration en NaCl de 2 p. 100 ralentit fortement la croissance de ces souches, sans toutefois l'inhiber totalement.

TABLEAU 2 - Caractéristiques biochimiques et physiologiques des souches composant les différents pathotypes de *Xanthomonas campestris* pv. *citri*.

Caractère étudié	Pathotype				
	A <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>	C <sup>c</sup>	D <sup>d</sup>	E (CBS) <sup>e</sup>
Gram (SUSLOW <i>et al.</i> , 1982)	-	-	-	-	-
Métabolisme respiratoire sur milieu MEVAG <sup>f</sup>	ox	ox	ox	ox	ox
Cytochrome C. oxydase (KOVACS, 1956)	-	-	-	-	-
Nitrate réductase (GARDAN et LUISETTI, 1982)	-	-	-	-	-
Uréase (Anonyme, 1981)	-	-	-	-	-
Production d'indole (Anonyme, 1981)	-	-	-	-	-
Production de pigments fluorescents (KING <i>et al.</i> , 1951)	-	-	-	-	-
Hydrolyse de :					
- l'amidon (GARDAN et LUISETTI, 1982)	+	+	+	+	+
- l'esculine (GARDAN et LUISETTI, 1982)	+	+	+	+	+
- la gélatine (FRAZIER, 1926)	+	-	-	-	+
- la gélatine (LELLIOTT <i>et al.</i> , 1966)	+	-	-	-	+
- la caséine	+	-	+	-	+
- la cellulose (OSHIRO <i>et al.</i> , 1964)	+	+	+	+	+
Tween estérase (SIERRA, 1957)	+	(+)	(+)	(+)	+
Production de H <sub>2</sub> S à partir de cystéine (DYE, 1962)	+	+	+	+	+
Activité pectinolytique (PRUNIER et KAISER, 1964)	v	-	-	-	v
Activité pectinolytique (HILDEBRAND, 1971)					
- pH 5,0	v	-	-	-	v
- pH 7,0	v	-	-	-	v
- pH 8,5	v	-	-	-	v
Hypersensibilité sur tomate (LELLIOTT et STEAD, 1987)	+	(+)	+	(+)	+
Croissance sur LPGA+ NaCl 1 p. 100	+	-	+	-	+
Croissance sur LPGA+ NaCl 2 p. 100	+	-	(+)	-	+
Croissance sur LPGA+ NaCl 5 p. 100	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase (THORNLEY, 1960)	-	-	-	-	-

+ : réaction positive (+) : réaction faiblement positive - : réaction négative

v : réaction variable selon les souches d'un même pathotype ox : oxydatif

a : 8 souches étudiées b : 8 souches étudiées c : 3 souches étudiées

d : 1 souche étudiée e : 2 souches étudiées

f : pas de virage de l'indicateur coloré après 14 jours pour les souches CFBP 2865 et 2900 (Pathotype A) et pour les souches CFBP 2868 et 2901 (pathotype B).

## DISCUSSION - CONCLUSION

L'étude de l'assimilation des substrats carbonés révèle un spectre homogène pour 116 substrats sur les 147 étudiés (78,9 p. 100) chez l'ensemble des souches de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (tableau 3). Une variabilité entre les pathotypes et à l'intérieur des pathotypes est mise en évidence pour les 31 autres substrats (tableau 4). Le profil d'assimilation de ces substrats ne permet pas de différencier nettement les types A et CBS. Ce groupe peut être séparé clairement des autres types par l'assimilation du maltose, de l'amidon et du glycogène. Les souches des pathotypes B et D possèdent des profils d'assimilation très proches. Seule l'assimilation de la L. histidine permet de les différencier. Les souches du pathotype C se distinguent de tous les autres types par les caractères D.  $\alpha$  alanine (non assimilée par les souches de type C), et L.Sérine (assimilée par les souches de type C mais pas par les autres souches).

Les résultats des profils biochimiques que nous avons obtenus pour les souches du pathotype B diffèrent de ceux de GOTO *et al.* (1980) pour la pectinolyse, la tolérance au NaCl et l'hydrolyse de la gélatine (tableau 5). Bien qu'il soit possible que les variations obtenues soient dues à l'utilisation de milieux différents, il est assez surprenant de noter que selon GOTO *et al.* (1980), les profils biochimiques des souches de type A et de type B soient quasiment identiques. L'appartenance au type B de toutes les souches décrites par ces auteurs a été par ailleurs confirmée par une lyse caractéristique en présence du phage CP3. Toutes les souches de type B incluses dans notre étude se sont également révélées sensibles au citriphage CP3, et ont réagi en ELISA avec l'un des trois anticorps monoclonaux (B1, B2 et B3) produits contre ce type, mais n'ont pas réagi avec les anticorps monoclonaux A1 et C1, produits

TABLEAU 3 - Liste des substrats carbonés assimilés ou non par l'ensemble des souches de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (lecture après 9 jours d'incubation).

Substrats assimilés		Substrats non assimilés				
Glycérol	Erythritol	D. Fucose	Subérate	Isophthalate	D.L. 3 Aminobutyrate	
Galactose <sup>a</sup>	L. Arabinose	D. Arabitol	Azélate	Terophthalate	D.L. 4 Aminobutyrate <sup>e</sup>	
G. Glucose	Ribose	L. Arabitol	Sébacate	Glycine	D.L. 5 Aminovalérate	
D. Fructose	L. Xylose	Gluconate	Glycolate	L. Leucine	D.L. 2 Aminobenzoate	
D. Mannose	Adonitol	2. Céto gluconate	D.L. 3 Hydroxybutyrate	L. Norleucine <sup>d</sup>	D.L. 3 Aminobenzoate	
N. Acétylglucosamine	$\alpha$ Méthylglucoside	5. Céto gluconate	D. Malate	D.L. Norvaline	D.L. 4 Aminobenzoate	
Esculine	L. Sorbose	Butyrate	D. Tartrate	D.L. 2 Aminobutyrate	Urea	
D. Cellobiose	Rhamnose	N. Valérate	L. Tartrate	L. Méthionine	Acétamide	
Saccharose	Dulcitol	Isovalérate	Mésotartrate	L. Phénylalanine	Sarcosine	
Tréhalose <sup>b</sup>	Inositol	N. Caproate	Levulinat	D. Tryptophane	Ethylamine	
$\beta$ Gentiobiose	Sorbitol	Heptanoate	Citraconate	L. Tryptophane	Butylamine	
Succinate	$\beta$ Méthylxyloside	Caprylate	Itaconate	Trigonelline	Amylamine	
Fumarate	$\alpha$ Méthylmannoside	Pélargonate	Mésaconate	L. Ornithine	Ethanolamine	
D.L. Glycérate	Arbutine	Caprate	Phénylacétate	L. Lysine	Benzylamine	
L. Malate	Salicine	Oxalate	Benzoate	L. Citruline	Ditaminobutane	
Pyruvate	Inuline	Malonate	o. Hydroxybenzoate	L. Arginine	Spermine	
2. Céto glutarate	D. Mélézitose	Maléate	m. Hydroxybenzoate	D.L. Kynurénine	Histamine	
p. Hydroxybenzoate <sup>c</sup>	Xylitol	Glutarate	D. Mandelate	Bétaïne	Tryptamine	
	D. Turanose	Adipate	L. Mandelate	Créatine		
	D. Tagatose	Pimélate	Phtalate	$\beta$ Alanine		
18 substrats assimilés soit 12,2 p. 100					98 Substrats non assimilés soit 67,7 p. 100	

a : exceptée CFBP 2900 b : exceptée CFBP 2866

c : les troubles et les changements de couleur sont interprétés comme une réaction positive.

d : exceptée CFBP 3238 e : exceptée CFBP 2525.

TABLEAU 4 - Assimilation différentielle de substrats carbonés par *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (lecture après 9 jours d'incubation).

Substrats	Pathotype				
	A <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>	C <sup>c</sup>	D <sup>d</sup>	E (CBS) <sup>e</sup>
D. Xylose	+	v	+	+	+
D. Arabinose	-	-	-	-	v
Mannitol	v	-	-	-	-
Amygdaline	v	-	-	-	v
Lactose	v	-	+	-	v
Maltose	+	-	-	-	+
D. Mélibiose	v	v	+	-	+
D. Raffinose	v	-	-	-	+
Amidon	+	-	-	-	+
Glycogène	+	-	-	-	+
D. Lyxose	+	v	-	+	+
L. Fucose	+	v	-	+	+
Acétate	v	v	-	+	+
Propionate	+	v	+	-	+
Isobutyrate	v	-	-	-	+
D.L. Lactate	v	v	-	+	+
Aconitate	v	v	-	-	+
Citrate	+	v	+	-	+
D. α Alanine	+	+	-	+	+
L. α Alanine	+	v	-	+	+
L. Isoleucine	v	-	+	-	v
L. Valine	v	-	-	-	-
L. Sérine	-	-	+	-	-
L. Thréosine	+	v	-	-	+
L. Cystéine	-	-	-	-	+
L. Tyrosine	-	-	-	-	v
L. Histidine	v	-	-	+	+
L. Aspartate	v	v	-	+	v
L. Glutamate	+	v	+	+	+
L. Proline	v	v	-	+	+
Glucosamine	-	v	-	+	-

+ : substrat assimilé

- : substrat non assimilé

v : assimilation variable selon les souches étudiées

a : 8 souches étudiées  
b : 8 souches étudiées  
e : 2 souches étudiées.

c : 3 souches étudiées d : 1 souche étudiée

respectivement contre les types A et C (ALVAREZ *et al.*, 1987 ; ALVAREZ et BENEDICT, 1990 ; ALVAREZ et PRUVOST, données non publiées).

L'étude de l'assimilation de substrats carbonés fait apparaître des variations dans l'assimilation d'un même substrat en fonction des conditions et des milieux retenus (tableau 5). Toutefois, il semble que le système API, qui permet une bonne standardisation des conditions de travail, soit assez bien approprié à ce type d'étude. La suspicion d'un trouble de croissance après 9 jours d'incubation peut être facilement levée après étalement de la culture et observation de sa pureté.

Le comportement des isolats de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* étudiés au niveau biochimique et physiologique confirme l'existence d'une variabilité entre les pathotypes tels qu'ils ont été décrits et révèle une variabilité interne aux pathotypes. Les types A et CBS n'ont pu être aisément distingués par leur profil biochimique et leur profil d'assimilation. Cependant, les différences fondamentales existant au niveau de leurs symptomatologies respectives, ainsi que des études sérologiques et des études de la struc-

ture de leur ADN mettent bien en évidence l'appartenance de chacun d'eux à des groupes distincts (HARTUNG et CIVEROLO, 1987 ; GABRIEL *et al.*, 1988 ; HARTUNG et CIVEROLO, 1989 ; PERMAR et GOTTWALD, 1989). De même, ces travaux révèlent une hétérogénéité dans la population des souches de Floride qui apparaît aussi au niveau biochimique et physiologique sur les deux souches retenues dans notre étude. Cette forte variabilité interne au type CBS confirme l'hypothèse de l'existence de plusieurs origines pour la maladie du «Citrus Bacterial Spot». GRAHAM *et al.* (1990) ont mis en évidence que certains pathovars de *Xanthomonas campestris* non isolés de *Citrus* exprimaient sur Citrumelo cv. Swingle une réaction pathogène similaire à celle des souches de CBS appartenant au groupe le moins agressif. L'existence apparente d'une large gamme d'hôtes pour ces souches remet en cause le concept de pathovar chez cette espèce.

Les profils biochimique et d'assimilation des substrats carbonés des souches de type B et de la souche de type D se confondent. Seule l'assimilation de la L. histidine permet de les différencier. Cependant, le faible nombre de souches de type B et de type D nous empêche de conclure de façon

TABLEAU 5 - Caractéristiques biochimiques et utilisation de substrats carbonés par *Xanthomonas campestris* pv. *citri* selon les données recueillies dans la littérature.

Caractère étudié	Pathotypes décrits										
	A <sup>1</sup>	A <sup>2</sup>	B <sup>2</sup>	A <sup>3</sup>	A <sup>4</sup>	CBS <sup>4</sup>	A <sup>5</sup>	B <sup>5</sup>	C <sup>5</sup>	A <sup>6</sup>	B <sup>6</sup>
Pectinolyse	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	+	+
Croissance sur NaCl 3 p. 100	NR	NR	NR	v	+	+	NR	NR	NR	+	+
Croissance sur NaCl 4 p. 100	NR	NR	NR	NR	-	-	NR	NR	NR	-	-
Hydrolyse de la caséine	NR	NR	NR	+	NR	NR	NR	NR	NR	+	+
Hydrolyse de la gélatine	NR	+	v	+	+	+	NR	NR	NR	+	+
Utilisation de substrats carbonés	Ac, As	Ac	Ac	Ac	As	As	As	As	As	As	As
Maltose	+	+	-	NR	NR	NR	+	-	+	+	-
Lactose	v	+	-	+	-	v	v	-	+	+	-
Amidon	+	NR	NR	NR	NR	NR	v	-	+	+	+
Malate	+	NR	NR	NR	NR	NR	v	-	+	+	+
Arabinose	NR	NR	NR	+	-	+	v	-	-	-	-
Xylose	+	NR	NR	NR	NR	NR	v	+	+	+	+
Fructose	+	+	-	NR	+	+	v	+	+	+	+
Mannose	v	NR	NR	+	v	+	+	+	+	+	+
Saccharose	NR	+	-	NR	+	+	v	+	+	-	-
Glycérol	+	NR	NR	NR	+	+	v	+	+	+	+
Mannitol	v	+	-	+	NR	NR	v	+	+	v	+
Malonate	NR	NR	NR	NR	+	+	v	-	-	+	v
Citrate	+	NR	NR	+	+	+	-	-	-	+	+

+ : réaction positive      - : réaction négative      v : réaction variable selon les souches  
 NR : test non réalisé      Ac : lecture de l'assimilation du substrat par acidification du milieu.  
 As : lecture de l'assimilation du substrat par croissance  
 1 : selon GOTO (1962)      2 : selon ALCARAZ (1977)      3 : selon WU *et al.* (1986)  
 4 : selon MIZUNO *et al.* (1988)      5 : selon LAVILLE (1985)      6 : selon GOTO *et al.* (1980)

définitive. Il faudrait étudier un plus grand nombre de souches de chaque pathotype pour déterminer si l'assimilation de la L. histidine est réellement un caractère discriminant. Les similitudes au niveau de leur structure antigénique (ALVAREZ *et al.*, 1987) et de leur empreinte génomique (HARTUNG et CIVEROLO, 1987) ou de leur profil après analyse du polymorphisme de la longueur de fragments de restriction (RFLP (GABRIEL *et al.*, 1988 ; HARTUNG et CIVEROLO, 1989) ainsi que leur sensibilité commune au citriphage CP3 rendent pratiquement impossible la distinction entre ces deux types. La séparation de ces souches en deux pathotypes simplement basée sur une

origine géographique et des hôtes d'isolement différents ne nous apparaît plus fondée.

Les principaux pathotypes décrits (A, B et C) peuvent donc être facilement caractérisés par l'utilisation de tests biochimiques rapides à mettre en oeuvre et moins coûteux que celle d'anticorps monoclonaux ou de RFLP, ce qui rend ces techniques très difficiles à mettre en oeuvre dans des pays en voie de développement hébergeant le chancre bactérien des agrumes. La division en pathotypes au sein du pathovar *citri* est confirmée par l'existence de traits caractéristiques à chacun d'eux.

#### REMERCIEMENTS

*Les auteurs tiennent vivement à remercier Edwin CIVEROLO pour ses suggestions, et pour la relecture de cet article. Nos remerciements vont également à Anne ALVAREZ, qui nous a gracieusement fourni des anticorps monoclonaux.*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALCARAZ (F. de), 1977.  
Variabilidad de *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow. en aislamientos de distinta procedencia.  
*Fitopatología*, 12 (1), 6-14.
- ALCARAZ (F. de), 1980.  
Variabilidad de *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow. en el litoral argentino.  
*Fitopatología*, 15 (2), 7-12.
- ALVAREZ (A.M.), BENEDICT (A.A.), MIZUMOTO (C.Y.) and CIVEROLO (E.L.). 1987.  
Mexican Lime Bacteriosis examined with monoclonal antibodies.  
*In Plant Pathogenic Bacteria. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, E.L. CIVEROLO, A. COLLMER: R.E. DAVIS and A.G. GILLESPIE Eds. Martinus Nijhoff, Dordrecht, 847-852.
- ALVAREZ (A.M.) and BENEDICT (A.A.). 1990.  
Relationships among phytopathogenic bacteria distinguished with monoclonal antibodies.  
*Proc. 7th Int. Conf. Plant Path. Bact., Part B, Budapest, Hungary, June 11-16, 1989*, Z. KLEMENT Ed., Akademiai Kiado, Budapest 859-863.
- ANONYME. 1981.  
Milieux et réactifs de laboratoire Pasteur.  
*Institut Pasteur Production. Ed. J. Grou-Radenez, Paris*, 589 p.
- BECERRA (S.), MEDINA (U.V.M.), GARZA (J.G.) and OROZCO (M.). 1988.  
Citrus leaf spot, a new mexican lime disease : a review.  
*Int. Citrus Congress, Middle East, Int. Soc. Citriculture, Tel Aviv, Israel, March 6-11, 33*.
- BRUN (J.). 1971.  
Le chancre bactérien des Citrus.  
*Fruits*, 26 (7-8), 533-540.
- CALAVAN (E.C.). 1956.  
Citrus canker. A bacterial disease caused by *Xanthomonas citri*.  
*Bull. Dept. Agr.*, 45 (4), 259-262.
- CIVEROLO (E.L.). 1981.  
Citrus bacterial canker disease : an overview.  
*Proc. Int. Soc. Citriculture*, 1, 390-394.
- CIVEROLO (E.L.). 1984.  
Bacterial canker disease of citrus.  
*J. Rio Grande Val. Hort. Soc.*, 37, 127-145.
- CIVEROLO (E.L.). 1985.  
Indigenous plasmids in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*.  
*Phytopathology*, 75 (5), 524-528.
- CIVEROLO (E.L.) and FAN (F.). 1982.  
*Xanthomonas campestris* pv. *citri* detection and identification by enzyme-linked immunosorbent assay.  
*Plant Dis.*, 66 (3), 231-236.
- DYE (D.W.). 1962.  
The inadequacy of the usual determinative test for the identification of *Xanthomonas* spp.  
*N.Z. J. Sci.*, 5 (4), 393-416.
- DYE (D.W.), BRADBURY (J.F.), GOTO (M.), HAYWARD (A.C.), LELLIOT (R.A.) and SCHROTH (M.N.). 1980.  
International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotypes strains.  
*Rev. Plant Pathol.*, 59 (4), 153-168.
- FAWCETT (H.S.) and JENKINS (A.E.). 1933.  
Records of citrus canker from herbarium specimens of the genus *Citrus* in England and the United States.  
*Phytopathology*, 23 (10), 820-824.
- FRAZIER (W.C.). 1926.  
A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria.  
*J. Inf. Dis.*, 39, 302.
- GABRIEL (D.W.), HUNTER (J.E.), KINGSLEY (M.T.), MILLER (J.W.) and LAZO (G.R.). 1988.  
Clonal population structure of *Xanthomonas campestris* and genetic diversity among citrus canker strains.  
*MPMI*, 1 (2), 59-65.
- GABRIEL (D.W.), KINGSLEY (M.T.), HUNTER (J.E.) and GOTTWALD (T.). 1989.  
Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains.  
*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39 (1), 14-22.
- GARDAN (L.) et LUISETTI (J.). 1982.  
Méthodes d'isolement et d'identification des bactéries phytopathogènes.  
*INRA, Angers, Station de Pathologie végétale et de Phytobactériologie*, 32 p.
- GOTO (M.). 1962.  
Studies on citrus canker.  
*Bull. Fac. Agric. Shizuoka Univ. Iwata, Japan*, 12, 3-12.
- GOTO (M.), TAKAHASHI (T.) and MESSINA (M.A.). 1980.  
A comparative study of the strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* isolated from Citrus Canker in Japan and Cancrosis B in Argentina.  
*Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 46, 329-338.
- GRAHAM (J.H.) and GOTTWALD (T.R.). 1990.  
Variation in aggressiveness of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* associated with citrus bacterial spot in Florida Citrus nurseries.  
*Phytopathology*, 80 (2), 190-196.
- GRAHAM (J.H.), HARTUNG (J.S.), STALL (R.E.) and CHASE (A.R.). 1990.  
Pathological, restriction - fragment length polymorphism, and fatty acid profile relationships between *Xanthomonas campestris* from citrus and noncitrus hosts.  
*Phytopathology*, 80 (9), 829-836.
- HARTUNG (J.S.) and CIVEROLO (E.L.). 1987.  
Genomic fingerprints of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains from Asia, South America and Florida.  
*Phytopathology*, 77 (2), 282-285.
- HARTUNG (J.S.) and CIVEROLO (E.L.). 1989.  
Restriction - fragment length polymorphism distinguish *Xanthomonas campestris* strains isolated from Florida citrus nurseries from *X. c. pv. citri*.  
*Phytopathology*, 79 (7), 793-799.
- HILDEBRAND (D.C.). 1971.  
Pectate and pectin gels for differentiation of *Pseudomonas* sp. and other bacterial plant pathogens.  
*Phytopathology*, 61, 1430-1436.
- HUGH (R.) and LEIFSON (E.). 1953.  
The taxonomic significance of fermentative versus oxydative metabolism carbohydrates by various Gram-negative bacteria.  
*J. Bacteriol.*, 66, 24-26.
- KING (E.), WARD (M.K.) and RANEY (D.E.). 1951.  
Two simple media for the demonstration of pyocyanin or fluorescein.  
*J. Lab. Clin. Medic.*, 44, 301-307.
- KOIZUMI (M.). 1985.  
Citrus canker : the world situation. 2-7.  
*In Citrus canker : an international perspective*. L.W. Timmer, ed. IFAS, University of Florida, Lake Alfred, 28 p.
- KOVACS (N.). 1956.  
Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by oxidase reaction.  
*Nature*, 178, 703.
- KUBICEK (Q.B.), CIVEROLO (E.L.), BONDE (M.R.), HARTUNG (J.S.) and PETERSON (G.L.). 1989.  
Isozymes analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*.  
*Phytopathology*, 79 (3), 297-300.
- LAVILLE (J.). 1985.  
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.  
*Fruits*, 40 (11), 719-738.
- LEE (H.A.). 1918.  
Further data on the susceptibility of rutaceous plants to citrus canker.  
*J. Agric. Res.*, 15 (12), 661-665.
- LELLIOTT (R.A.), BILLING (E.) and HAYWARD (A.C.). 1966.  
A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*.  
*J. Appl. Bact.*, 29 (3), 470-489.
- LELLIOTT (R.A.) and STEAD (D.E.). 1987.  
Methods in plant pathology, Vol. 2 : Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants.  
*Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Palo Alto, Melbourne*, 216 p.

- MIZUNO (A.), KAWAI (A.), NISHIO (T.) and NAGAO (N.). 1988.  
Comparison of causal bacteria of «Citrus Canker» in Florida and Japanese Citrus Canker bacteria.  
*Res. Bull. Pl. Prot. Japan*, 24, 21-25.
- NAMEKATA (T.) and OLIVEIRA (A.R. de). 1972.  
Comparative serological studies between *Xanthomonas citri* and a bacterium causing canker on mexican lime.  
*Proc. 3rd Int. Conf. Plant Path. Bact.*, Wageningen, Netherlands, April 14-21, 1971, 151-152.
- NAMEKATA (T.) and BALLMER (E.). 1977.  
Comparative studies on pathogenicity among causal agents of the three citrus canker.  
*Proc. 1st Int. Cong. Citriculture, Murcia, Spain, April 29 - May 10, 1973*, II, 659-662.
- OSHIRO (L.S.), HINE (R.B.) and GOTO (S.). 1964.  
The identification of *Pseudomonas andropogonis* as a cause of a firm rot disease of the Terete Vanda orchid in Hawaii.  
*Plant Dis. Rep.*, 48 (9), 736-740.
- PERMAR (T.A.) and GOTTWALD (T.R.). 1989.  
Specific recognition of a *Xanthomonas campestris* Florida Citrus nursery strain by a monoclonal antibody probe in a microfiltration enzyme immunoassay.  
*Phytopathology*, 79 (7), 780-783.
- PRUNIER (J.P.) et KAISER (P.). 1964.  
Etude de l'activité pectinolytique chez les bactéries phytopathogènes et saprophytes des plantes.  
I.- Recherche des enzymes pectinolytiques.  
*Ann. Epiphyt.*, 15 (3), 205-219.
- ROSSETTI (Victoria). 1977.  
Citrus Canker in Latin America : a review.  
*Proc. Int. Soc. Citriculture*, 3, 918-924.
- ROISTACHER (C.N.) and CIVEROLO (E.L.). 1989.  
Citrus bacterial canker disease of lime trees in the Maldive Islands.  
*Plant Dis.*, 73 (4), 363-367.
- SANCHEZ (L.D.) y LOAIZA (R.R.). 1983.  
Bacteriosis del limonero mexicano (*Citrus aurantifolia*).  
*FAO Plant Prot. Bull.*, 31 (3), 131-132.
- SANCHEZ-ANGUIANO (H.M.) and FELIX-CASTRO (F.A.). 1984.  
An overview of Citrus canker (bacteriosis) on mexican lime at Tecoman, Colima, Mexico.  
*Proc. Int. Soc. Citriculture*, vol. 1, 323-324.
- SCHOULTIES (C.L.), MILLER (J.W.), CIVEROLO (E.L.) and SASSER (M.). 1985.  
A new outbreak of citrus canker in Florida.  
*Plant Dis.*, 69, 361.
- SIERRA (G.). 1957.  
A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates.  
*Antonie van Leeuwenhoek*, 23, 15-22.
- STALL (R.E.), MILLER (J.W.), MARCO (G.M.) and CANTEROS (B.I.C.). 1982.  
Pathogenicity of the three strains of citrus canker organism on grapefruit.  
*Proc. 5th Int. Conf. Plant Path. Bact.*, August 16 - 23, 1981. Cali, Colombia, 334-340.
- SUSLOW (T.W.), SCHROTH (M.N.) and ISAKA (M.). 1982.  
Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining.  
*Phytopathology*, 72 (7), 917-918.
- THORNLEY (M.J.). 1960.  
The differentiation of *Pseudomonas* from other gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism.  
*J. Appl. Bacteriol.*, 23, 37-52.
- VAUTERIN (L.), SWINGS (J.), GILLIS (M.), KESTERS (K.), MEW (T.W.), SCHROTH (M.N.), PALLERONI (N.J.), HILDEBRAND (D.C.), STEAD (D.E.), CIVEROLO (E.L.), HAYWARD (A.C.), MARAITE (H.), STALL (R.E.), VIDAVER (A.K.) and BRADBURY (J. F.). 1990.  
Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*.  
*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40, 312-316.
- WU (W.C.), JU (S.H.), LEE (S.J.), MAA (S.J.), HUANG (M.L.), YANG (B.C.), KUO (H.F.) and HSUEH (Y.K.). 1986.  
Variations in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*.  
*Plant Prot. Bull. (Taiwan R.O.C.)*, 28, 241-252.
- YOUNG (J.M.), BRADBURY (J.F.) and VIDAVER (A.K.). 1990.  
The impact of molecular biological studies on the nomenclature of plant pathogenic bacteria.  
*Proc. 7th Int. Conf. Plant Path. Bact.*, Budapest, Hungary, June 11-16, 1989, Z. KLEMENT Ed., Akademiai Kiado, Budapest, 659-661.

Reçu : décembre 1990

Accepté : avril 1991

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD BIOQUIMICA Y FISIOLÓGICA DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CITRI* AGENTE DEL CHANCRO BACTERIANO DE LOS CITRICOS.

C. VERNIERE, M. DEVAUX, O. PRUVOST, A. COUTEAU y J. LUISETTI.

*Fruits*, Mar.-Apr. 1991, vol. 46, n° 2, p. 153-161.

RESUMEN - Veintidos cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* representativas de los patotipos A, B, C, D (Citrus canker) y E (Citrus Bacterial Spot CBS) fueron estudiadas por sus características bioquímicas y fisiológicas, así como por su perfil de asimilación de 147 substratos carbonados. El medio MEVAG evaluado, permitió evidenciar el metabolismo oxidativo de la glucosa de manera más neta que el medio de HUGH y LEIFSON clasicamente utilizado. La hidrólisis de la gelatina, caseína y la tolerancia al NaCl permiten clasificar las cepas en tres grupos. Un espectro de asimilación homogénea fue observado en 116 substratos carbonados. Las cepas de tipo A y CBS pueden ser separadas de los tipos B, C, D por su asimilación de maltosa, almidón y glicógeno. Las cepas de los patotipos B y D poseen perfiles de asimilación muy próximos. Las cepas de tipo C se distinguen de los otros tipos por los caracteres D.  $\alpha$  alanina, y L. serina.