

# LNPV

Laboratoire

National de la

Protection des

Végétaux

Mise en évidence de *Xanthomonas*  
*arboricola* pv. *pruni*

à partir de végétal symptomatique

par isolement

et identification de la souche

Réf.: Méthode BL/06/01 version a

**Laboratoire national de la protection des  
végétaux, unité bactériologie**

**LNPV-UB**

7 rue Jean Dixméras

49044 ANGERS cedex 01

Tél : 02 41 72 32 40.

**MISE EN EVIDENCE DE *XANTHOMONAS ARBORICOLA* PV. *PRUNI***  
**A PARTIR DE VETEGAL SYMPTOMATIQUE**  
**PAR ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE LA SOUCHE**

---

**Sommaire**

Précautions de sécurité .....	3
0. Introduction .....	3
1. Objet .....	3
2. Domaine d'application.....	3
3. Références .....	4
4. Définitions .....	4
5. Principe .....	4
6. Réactifs et produits.....	4
6.1.Milieus de culture .....	4
6.2.Réactifs pour mis en évidence cytochrome C oxydase .....	4
6.3.Solution de potasse .....	4
6.4.Ethanol .....	4
6.5.Eau déminéralisée stérile.....	4
7.Appareillage .....	4
8. Prélèvement sur échantillon .....	5
9. Mode opératoire .....	5
9.1.Témoins d'analyse.....	5
9.2.Déroulement du test.....	5
9.2.1.Extraction .....	5
9.2.2.Isolement .....	5
9.2.3.Incubation.....	5
9.2.4.Lecture.....	6
9.2.5.Repiquage et identification.....	6
9.3.Interprétation .....	7
10.Expression des résultats .....	7
11.Bibliographie.....	8
Annexes.....	9
<b>Annexe I</b> : Milieux.....	9
<b>Annexe II</b> : Métrologie : exigences relatives aux prescriptions et aux erreurs maximales tolérées (EMT) .....	12

# MISE EN EVIDENCE DE *XANTHOMONAS ARBORICOLA* PV. *PRUNI*

## A PARTIR DE VETEGAL SYMPTOMATIQUE

### PAR ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE LA SOUCHE

---

#### **Précautions de sécurité.**

La bactérie *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* n'est pas connue pour être pathogène pour l'homme. Sa manipulation ne requiert donc pas de précautions particulières en termes d'hygiène et de sécurité des opérateurs.

Par contre, il s'agit d'une bactérie de quarantaine pour l'Union Européenne et de nombreux autres pays. En France, en application de la directive 95/44/CE, sa détention et sa manipulation exigent des précautions en terme de confinement et sont soumises à autorisation préfectorale préalable.

Comme pour toute autre manipulation d'agents phytopathogènes, on veillera en particulier à inactiver les bactéries présentes dans les végétaux, extraits végétaux, supports de culture, effluents liquides, par une méthode appropriée.

#### **0. Introduction.**

*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* est la bactérie responsable des tâches foliaires sur *Prunus* spp (abricotier, pêcher, prunier...). L'agent causal de la maladie des taches bactériennes a été identifié par Smith *et al*, en 1903 aux Etats-Unis.

En France, la bactérie a été identifiée pour la première fois en 1995 dans le Gard.

Selon les conditions climatiques, la bactérie peut provoquer des dégâts plus ou moins importants. Les pluies, des températures élevées, une humectation prolongée du feuillage et des rosées favorisent le développement de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*.

#### **1. Objet.**

La méthode utilisée permet l'isolement direct de la bactérie sur matériel végétal de *Prunus* et son identification.

#### **2. Domaine d'application.**

Cette méthode qualitative s'applique à la mise en évidence de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* sur végétal présentant des symptômes. Elle est à utiliser pour toutes les analyses réglementaires.

Statut réglementaire de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*: cette bactérie figure dans les annexes IIA, IVAI de l'arrêté du 22 novembre 2002 modifié, transposant la directive 2000/29/CE. Elle fait partie de la liste des organismes nuisibles dont l'introduction et la dissémination doivent être interdites dans tous les Etats membres de l'union européenne s'ils se trouvent sur certains végétaux ou produits végétaux, présents dans l'Union Européenne mais importants pour cette dernière.

### 3. Références.

La méthode décrite ici s'appuie en partie sur le projet de protocole de diagnostic pour les organismes réglementés de l'Organisation Européenne et méditerranéenne de Protection des Plantes, élaboré par le groupe d'experts en bactériologie.

### 4. Définitions.

**LPGA** : Levure Peptone Glucose Agar

**GYCA** : Glucose Yeast Carbonate de calcium Agar

**ARJ** : Ajers, Rupp et Johnson

Voir compositions de ces milieux en annexe I.

### 5. Principe.

L'utilisation d'un milieu nutritif généraliste favorise le développement des bactéries en général et de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. Après **une extraction** (par macération) des bactéries à partir de végétal, **un isolement** est pratiqué sur boîtes de Petri. **L'identification** des colonies isolées est réalisée par des tests biochimiques. La souche bactérienne mise en évidence est conservée en collection.

### 6. Réactifs et produits.

Les produits spécifiques pour la réalisation de cette méthode sont décrits ci-après.

**6.1.** Milieux de culture : leurs composition, préparation et conditions d'emploi sont données en annexe I.

- pour l'isolement et le repiquage: utilisation du milieu LPGA.

- pour les tests biochimiques: milieux tween 80, esculine, amidon, GYCA, ARJ, gélose au lait.

**6.2.** Réactif pour la mise en évidence d'une activité cytochrome C oxydase (solution aqueuse à environ 1% d'oxalate de N,N-diméthyl paraphénylène diamine) et papier filtre, ou réactifs prêts à l'emploi type bandelettes..

**6.3.** Solution de potasse (solution aqueuse à 3% de KOH).

**6.4.** Ethanol à 70° GL et à 96° GL.

**6.5.** Eau déminéralisée stérile.

### 7. Appareillage.

Concernant les exigences métrologiques générales sur les équipements, se référer à l'annexe II. Les exigences spécifiques sont précisées dans le texte.

Matériel courant de laboratoire de bactériologie et notamment :

- incubateur bactériologique assurant une température de 27°C;

- réfrigérateur;

- système de production d'eau déminéralisée de qualité « laboratoire » courante ;

- autoclave ;

- balance de classe I et éventuellement balance de classe II

## **8. Prélèvement sur échantillon.**

La méthode s'applique aux échantillons divers tels que feuilles, rameaux, tiges et fruits présentant des symptômes.

L'échantillon désigne ici la partie du végétal reçue au laboratoire à partir de laquelle l'extraction est réalisée.

- sélectionner les parties de végétal présentant des symptômes jeunes, les désinfecter superficiellement à l'aide de coton imbibé d'éthanol à 70°GL;
- prélever au scalpel un morceau de végétal en bordure de lésion et le placer dans une boîte de Petri stérile. Assurer la désinfection des instruments entre chaque prélèvement (par exemple, flamber le scalpel après trempage dans l'éthanol à 96°GL) .

## **9. Mode opératoire.**

### **9.1. Témoins d'analyse.**

Des souches témoins positifs sont utilisées lors de l'isolement : souches de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* dont l'identité a été préalablement vérifiée sur milieu . Des souches satisfaisantes sont déposées à la Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP - INRA -42, rue Georges Morel -BP 60057 - 49071 Beaucouzé cedex) ou disponibles auprès d'autres collections de référence.

La souche pathotype est la souche CFBP 2535 (elle a été isolée en 1953 de *Prunus salicina* en Nouvelle-Zélande par Dye D.W.T1). Les références des autres collections pour cette souche sont : ATCC 19316, ICMP 51 et LMG 852.

La manipulation de ces souches témoins doit s'effectuer de manière séparée dans l'espace et/ou dans le temps de façon à éviter toute contamination accidentelle des échantillons.

### **9.2. Déroulement du test.**

#### **9.2.1. Extraction.**

- en conditions axéniques, ajouter environ 2 mL d'eau déminéralisée stérile dans la boîte de Petri contenant le morceau de végétal prélevé;
- dilacérer finement le morceau de végétal à l'aide d'un scalpel;
- laisser macérer environ 10 minutes à température ambiante.

Les instruments utilisés pour dilacérer sont désinfectés entre chaque échantillon (par exemple, flamber le scalpel après trempage dans l'éthanol à 96°GL) .

#### **9.2.2. Isolement.**

- réaliser un étalement par épuisement en 3 secteurs à l'aide d'anses stériles ou étaler un volume d'environ 100 µL sur toute la surface de la boîte de milieu à l'aide d'un étaloir sur une boîte de milieu LPGA.

#### **9.2.3. Incubation.**

- incuber les boîtes de Petri à 27°C pendant au moins 72 h.

#### 9.2.4. Lecture.

Observer les boîtes. Sur le milieu de culture LPGA, les colonies de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* apparaissent en 48 heures, de couleur jaune, muqueuses, circulaires et tendant à s'étaler.

#### 9.2.5. Repiquage et identification

Repiquer une colonie typique par boîte sur milieu de culture LPGA pour confirmer les caractéristiques décrites plus haut. Pour compléter leur identification, les souches subiront les tests suivants :

- test à la potasse indicateur du GRAM (Suslow *et al.*, 1982): déposer une goutte d'une solution aqueuse à 3% de KOH sur une lame de microscopie. A l'aide d'une anse, faire une émulsion de culture bactérienne âgée de 24 à 48 heures avec la solution. Le gram est considéré négatif si il y a formation de filament en soulevant l'anse. Le gram est considéré positif en l'absence de filament.
- test de mise en évidence de l'activité cytochrome C oxydase (Klement *et al.*, 1990): déposer une goutte d'une solution aqueuse à environ 1% d'oxalate de N,N, diméthyl paraphénylène diamine, préparée extemporanément, sur du papier buvard. Faire une émulsion immédiate d'une anse de culture sur le buvard imbibé. Il est également possible d'utiliser des réactifs prêts à l'emploi ou un autre dispositif équivalent. L'apparition d'une coloration rose violacée atteste de l'activité de la cytochrome C oxydase. Dans ce cas le test est considéré positif. Le test est négatif en l'absence de coloration.
- test de mise en évidence de l'hydrolyse de l'esculine (Lelliott et Stead, 1987) : prélever de la culture bactérienne (âgée de 24 à 72 heures). Ensemencer en strie sur boîte de Petri contenant du milieu Esculine (annexe I point 2). Incuber pendant environ 72 h à 27°C . Lorsque le milieu devient noir autour de la colonie, le test de mise en évidence de l'hydrolyse de l'esculine est positif. Lorsque la coloration du milieu reste inchangée le test est négatif.
- test de mise en évidence de l'activité tween-esterase (Schaad *et al.*, 2001) : prélever de la culture bactérienne (âgée de 24 à 48h). Ensemencer en strie sur une boîte de Petri contenant du Tween 80 (annexe I point 3). Incuber pendant environ 72h à 27°C. Le test est positif (présence d'une activité tween-estérase) lorsque les acides gras libérés par les estérases se complexent aux ions  $Ca_2^+$  pour former un précipité autour de la culture bactérienne. Le test est négatif (absence de tween-estérase) lorsque le milieu reste inchangé.
- test de mise en évidence de l'hydrolyse de l'amidon (Schaad *et al.*, 2001): prélever de la culture bactérienne (âgée de 24 à 48 h). Ensemencer en stries une boîte de Petri contenant du milieu amidon (annexe I point 4). Incuber pendant environ 72 h à 27°C. Gratter la colonie avec une lamelle puis ajouter une solution de lugol (annexe I point 5) sur le milieu. Lorsqu'il se forme un halo clair autour de la colonie, le test de mise en évidence de l'hydrolyse de l'amidon est positif. Si le milieu reste inchangé, le test est négatif.
- test de mise en évidence de la digestion de la caséine (Schaad *et al.*, 2001): prélever de la culture bactérienne âgée de 24 à 48 h. Ensemencer en stries sur un milieu gélosé au lait (annexe I point 6). Incuber jusqu'à 7 jours à 27°C. Le test est positif lorsqu'on observe une zone claire autour de la culture. Il est négatif quand le milieu reste inchangé.

- test de croissance sur milieu GYCA (méthode BHs/99/02 version b): prélever de la culture bactérienne âgée de 24 à 48 h. Ensemencer en strie sur un milieu GYCA (annexe I point 8) et incubé de 24 à 72 h à 27°C. Le test est positif lorsque la culture est jaune, bombée et muqueuse. Le test est négatif lorsque la culture est peu poussante et non muqueuse.
- test d'assimilation de l'arabinose (Ayers *et al.*, 1919): à l'aide d'une anse stérilisée à la flamme, prélever de la culture bactérienne âgée de 24 à 72 heures. Ensemencer par piqûre un tube gélosé contenant le milieu ARJ (annexe I point 7) additionné d'arabinose à une concentration de 0,1%. Incuber au moins 5 jours et jusqu'à 28 jours à 27°C. Lorsque l'indicateur coloré vire au jaune, attestant de l'assimilation de l'arabinose, le test est considéré positif. Le test est négatif en l'absence de coloration.

Les lots des milieux et/ou réactifs utilisés pour les tests sont vérifiés avant utilisation à l'aide de souches bactériennes témoins.

Résultats attendus pour les tests d'identification:

Test	Résultat attendu
- test à la potasse indicateur du GRAM	Présence d'un filament
- test de mise en évidence de l'activité cytochrome C oxydase	-
- test de l'hydrolyse de l'esculine	+
- test de l'activité tween-estérase	+
- test de mise en évidence de l'hydrolyse de l'amidon	-
- test de mise en évidence de la digestion de la caséine	+
- test de croissance sur milieu G.Y.C.A	+
- test d'assimilation de l'arabinose	+

### 9.3. Interprétation.

L'interprétation des résultats ne peut être validée que si les différents témoins donnent les résultats négatifs et positifs attendus. Dans ces conditions, lorsque les tests d'identification sont comparables à ceux de la souche de référence, le résultat de l'analyse de détection sur symptômes est considéré comme positif.

## 10. Expression des résultats.

Cette méthode étant qualitative, le résultat sera libellé de la façon suivante (ou de façon équivalente) :

⇒ lorsque le résultat de l'analyse de mise en évidence est négatif :

“ La bactérie *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* **n'a pas été mise en évidence** par isolement et tests biochimiques ”.

⇒ lorsque le résultat de l'analyse de mise en évidence est positif :

“ La bactérie *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* **a été mise en évidence** par isolement et tests biochimiques”.

## **11. Bibliographie**

Ayers, S.H., Rupp, P. & Johnson, W.T. (1919) A study of the alkali forming bacteria in milk. *United States Department of Agriculture Bulletin* **782**. Washington (US).

Freney, J., Renaud, F., Hansen, W. & Bollet, C. (1992) *Manuel de bactériologie clinique ELSEVIER Collection Option Bio* Volume 1, 79-143.

Klement, Z., Rudolph, K. & Sands, D.C. (1990) *Methods in phytobacteriology. Akademiai Kiad* 568p. Budapest (HG).

Lelliott, R.A. & Stead, D.E., (1987) *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Scientific Publications* Volume 2. Oxford (GB).

Schaad, N. W., Jones, J. B. & Chun, W. (2001) *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS Press. Third edition 373p. St Paul, Minnesota (US).

Suslow, T.V., Schroth, M.N. & Isaka M. (1982) Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* **72**, 917-918.

Méthode BHb99/02 version b : détection de *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* et *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* sur semences de haricots par isolement sur milieux nutritifs paru au JO du 4 novembre 2003.

## Annexes

### Annexe I : Milieux

#### Exigences générales

Les milieux sont coulés en boîtes de Petri stériles (par exemple diamètre 90 mm). Ils doivent être utilisés dans un délai d'un mois au plus après fabrication si le milieu contient des antibiotiques, et deux mois au plus si le milieu n'en contient pas.

Autoclavage (stérilisation) : est considéré comme stérile tout produit traité par surpression de 1 bar à 121°C pendant 15 minutes.

**Les compositions sont données pour 1 litre  $\pm$  5% de milieu à réaliser avec de l'eau sauf pour le GYCA pour 500 mL**

L'éthanol utilisé pour la préparation des milieux est titré à environ 96°GL.

#### 1. Milieu LPGA (Lelliott et Stead., 1987) :

- Extrait de levure .....5,0 g
- Peptone.....5,0 g
- D(+) Glucose.....10,0 g
- Bacto agar (Difco).....15,0 g
- pH.....7.0

Après autoclavage, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir être coulé en boîtes de Petri. Avant de couler le milieu, incorporer 0,05 g de cycloheximide dissout dans de l'éthanol et stérilisé par filtration.

#### 2. Milieu Esculine (Lelliott et Stead,1987))

- Peptone..... 10,0 g
- Citrate ammoniacal de fer III..... 0,50 g
- Esculine..... 1,0 g
- Agar bactériologique de type A ..... 12,0 g

Après autoclavage, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le couler en boîtes de Petri.

### **3. Milieu Tween 80 (Schaad et al, 2001)**

- Peptone..... 10.0 g
- Potassium bromide..... 10.0 g
- Calcium chlorure..... 0.34 g
- Agar bactériologique de type A ..... 15.0 g

Après autoclavage, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le couler en boîtes de Petri. Avant de couler le milieu, incorporer les produits suivant, qui seront dissout si nécessaire dans les solvants adéquats :

- Tween 80 stérile ..... 10.0 mL
- Cycloheximide (dans de l'éthanol) ..... 75.0 mg
- Céphaléxine(dans de l'eau stérile) ..... 25.0 mg
- 5-Fluorouracil(dans de l'eau stérile) ..... 6.0 mg
- Tobramycine(dans de l'eau stérile) ..... 5 mg

### **4.Milieu Amidon (Schaad et al, 2001)**

- Bouillon nutritif (Difco) : ..... 8,0 g
- Amidon soluble de pomme de terre : ..... 10,0 g
- Bacto Agar (Difco) : ..... 15,0 g
- Eau déminéralisée : ..... 1 L

Après autoclavage, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le répartir en boîtes de Petri.

### **5.Lugol (Schaad et al, 2001)**

- Iodine : ..... 5,0 g
- Potassium iodure : ..... 10,0 g
- Eau déminéralisée ..... 100 mL

Utilisation en diluant au 1/5<sup>ème</sup>

### **6.Milieu gélose au lait (Schaad et al., 2001)**

- Extrait de levure ..... 5,0 g
- Agar nutritif..... 23,0 g

Reconstitué du lait écrémé en poudre et stérilisé avec le mélange décrit précédemment pour obtenir 10%\* de lait dans le YNA (Yeast Nutrient Agar)

Après autoclavage à une température  $\geq$  à 121°C pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le répartir en boîtes de Petri.

\*10%=Pour 100mL de lait il faut diluer 10g de lait écrémé en poudre avec 90mL d'eau

### **7.Milieu ARJ (Ayers, Rupp & Johnson, 1919)**

- Dihydrogénophosphate d'ammonium..... 1,0 g
- Sulfate de magnésium heptahydraté ..... 0,2 g
- Chlorure de potassium..... 0,2 g
- Bleu de bromothymol..... 0,03 g
- Agar bactériologique de type A ..... 6,0 g

Faire fondre le milieu puis autoclaver. Le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le répartir en tubes. L'ajout d'agar est facultatif (milieu semi-gélosé ou milieu liquide)

### **8.Milieu GYCA (méthode Bhs/99/02 versionb)**

- D(+) glucose..... 2,5 g
- Extrait de levure ..... 2,5 g
- Carbonate de calcium..... 20,0 g
- Agar bactériologique de type A ..... 7.5 g
- Eau déminéralisée ..... 500 mL

Faire fondre le milieu avant de répartir 100 mL dans des flacons de 250 mL

Après autoclavage, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le répartir en boîtes de Petri.

Bien agiter avant les répartitions pour mettre en suspension le  $\text{CaCO}_3$ .

## **Annexe II : Métrologie : exigences relatives aux prescriptions et aux erreurs maximales tolérées (EMT)**

Les règles générales suivantes sont à observer dans le cadre des activités analytiques (dans le cas contraire, les spécifications sont précisées dans le texte) :

Volume:        volume < à 10 mL : EMT =  $\pm 10\%$   
                  Volume  $\geq$  à 10 mL : EMT =  $\pm 5\%$

Masse:         EMT =  $10\%$

pH:             EMT = 0,3 u

Température: incubateur bactériologique : EMT =  $\pm 3^{\circ}\text{C}$   
                  réfrigérateur : spécification =  $5^{\circ}\text{C}$  et EMT =  $\pm 4^{\circ}\text{C}$   
                  congélateur : spécification =  $\leq -15^{\circ}\text{C}$   
                  congélateur froid intense : spécification =  $\leq -65^{\circ}\text{C}$

Note 1 : les limites techniques des équipements et les conditions d'utilisation (ex : ouverture de portes) peuvent conduire à des dépassements temporaires d'EMT. L'amplitude de ces dépassements (valeur des grandeurs mesurables, durées) est à définir et à justifier techniquement par le laboratoire.

Note 2 : il est entendu que l'EMT exigée pour une prescription donnée est réduite de l'incertitude liée au processus de mesure (méthode, équipement de mesure, environnement, opérateur, mesurande) mis en oeuvre pour contrôler la grandeur concernée (exemple du pH : le laboratoire doit assurer une valeur de pH avec une EMT de 0,30. Cette EMT doit inclure les incertitudes de mesure du pH-mètre et de son électrode associée, l'incertitude sur la valeur des solutions étalons utilisées pour le raccordement du pH-mètre, l'incertitude due à l'influence de la température, la dérive du pH-mètre et de son électrode,...).

Dans le cas d'une enceinte thermostatique (incubateur, réfrigérateur,...), la prescription de température et l'EMT associée doivent être vérifiées dans le temps (stabilité) et dans l'ensemble du volume de travail (homogénéité). Les exigences de prescription et d'EMT intègrent l'incertitude de mesure du ou des thermomètres de contrôle (lesquels sont indépendants de la sonde de régulation de l'enceinte).