

Prévalence de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* dans les semences de tomate et d'aubergine de l'ouest du Burkina Faso

S. L. OUEDRAOGO¹ et C. N. MORTENSEN²

Résumé

Onze échantillons de semences de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) et dix d'aubergine (*Solanum melongena* L.) de la région Ouest du Burkina Faso ont été testés pour la présence de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* agent responsable du chancre bactérien. Le test en milieu liquide, l'ensemencement direct des semences sur milieu de culture solide et les tests sur symptômes de plantules sont les méthodes utilisées pour l'extraction des bactéries. Deux milieux de culture de bactéries (le milieu semi-sélectif pour *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (SCM) et Yeast Dextrose Calcium carbonate Agar (YDC), des tests biochimiques, sérologiques et de pathogénie ont été utilisés pour la détection, l'identification et la caractérisation des isolats. Plus de 27,3 % des échantillons de semences de tomate testés ont été infectés par *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* contre 20 % pour l'aubergine. Le test en milieu liquide est la meilleure méthode de détection de la bactérie dans les semences des espèces étudiées.

Mots-clés : Détection, solanées, semences, chancre bactérien, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, Burkina Faso.

Occurrence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato and eggplant seeds from the West Region of Burkina Faso

Abstract

Eleven seed samples of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and ten of eggplant (*Solanum melongena* L.) from the West Region of Burkina Faso were tested for the presence or absence of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Liquid assay (stomacher extractions), direct plating of seeds and seedling symptom tests were used for the extraction processes and for the comparison of the efficiency of the methods used. Two bacterial growth media (Semi-selective for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (SCM) et Yeast Dextrose Calcium carbonate Agar (YDC), biochemical, serological and pathogenicity tests have been used for the detection, identification and characterisation of the isolates. More than 27.3 % of tomato seed samples tested were infected by *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* against 20 % for eggplant. The liquid assay was the best method for the detection of the bacterium in seeds of species tested.

Keywords: detection, Solanaceous, Seed, bacterial canker, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, Burkina Faso.

¹ Institut de l'Environnement et Recherches Agricoles (INERA) BP 7192 Ouagadougou Burkina Faso

² Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries Thorvaldsensvej 57 DK-1871 Frederiksberg C Denmark.

Introduction

Le chancre bactérien causé par *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis est une maladie sérieuse qui apparaît dans plusieurs régions du monde. Son apparition est sporadique, mais il peut être dévastateur (GITAITIS *et al.*, 1991). La bactérie a été rencontrée pour la première fois au Michigan, États-Unis d'Amérique, en 1909 dans une serre et, depuis, elle a été signalée dans plusieurs zones de production de la tomate à travers le monde (OEPP/EPPO, 1992a).

Des pertes annuelles de 5 à 10 % et 60 % dans des serres isolées de production de tomate ont été notées en Ontario/(Canada) de 1965 à 1971 (SHERF et MACNAB, 1986). En France, des pertes de 20 à 30 % ont été observées dans des parcelles expérimentales (RAT *et al.*, 1991).

Bien que la bactérie puisse survivre dans le sol, la semence est considérée comme la plus importante source d'inoculum (FATMI *et al.*, 1991).

Le principal symptôme du chancre bactérien est le flétrissement systémique de la plante de tomate. Les premiers symptômes comprennent un retournement vers le bas des premières feuilles, les nécroses marginales, le flétrissement et l'enroulement vers le haut des bords des jeunes feuilles (GITAITIS, 1993). Sur l'aubergine on observe le chancre ou des lésions nécrotiques sur les feuilles, les tiges et les fruits de même que le flétrissement de la plante.

La bactérie peut être présente à la surface ou à l'intérieur de la semence (COOK *et al.*, 1952). Comme infectant interne, elle pénètre dans la semence à travers le hilum (RAT, 1984). *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* est une bactérie de quarantaine dans certains pays. Une infestation de 0,03 % de semences peut conduire à une augmentation de l'incidence de la maladie dans le champ (SCHAAD *et al.*, 1980).

L'utilisation des semences saines est le moyen le plus important pour le contrôle de la bactérie.

Le chancre bactérien sévit au Burkina Faso mais son incidence au champ n'est pas connue. Cependant, compte tenu de son mode de transmission, il nous est apparu nécessaire d'évaluer l'incidence de la bactérie dans des lots de semences obtenues de différentes localités de la région Ouest du Burkina Faso. Cette approche nous a permis d'appréhender l'importance de la maladie dans cette zone où la production des solanacées maraîchères est la plus importante du pays.

Matériels et méthodes

Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de semences de tomate, d'aubergine violette et d'aubergine africaine. Ce sont des semences non traitées collectées en 1996 chez les producteurs (tableau I).

Tableau I. Variétés et lieux de collecte des semences de tomate et d'aubergine au Burkina Faso (1996).

^a Numéro d'accession (DGISP)	Espèce/Variété	Lieu de collecte
39597	^b Tomate/-	Léguema
39632	Aubergine/Black beauty	Vallée du Kou
39633	^c Aubergine violette/-	Badara
40624	Tomate/-	Léguema
40625	Tomate/Petomech	Léguema
40626	Tomate/Slumac	Léguema
40628	Tomate/Rossol	Léguema
40629	Tomate/Rossol	Léguema
40630	Tomate/Petomech	Léguema
40631	Tomate/-	Léguema
40633	Tomate/-	Vallée du Kou
40634	Tomate/-	Vallée du Kou
40635	Tomate/-	Vallée du Kou
40636	Aubergine/-	Léguema
40637	Aubergine/-	Léguema
40639	Aubergine/-	Léguema
40644	Aubergine/-	Léguema
41853	Aubergine/africaine	Banakélédaga
41854	Aubergine/africaine	Banakélédaga
41856	Aubergine/africaine	Banakélédaga
41857	Aubergine/africaine	Banakélédaga

^aNuméro d'accession des échantillons déposés à l'Institut Danois de Pathologie des Semences pour les Pays en Voie de Développement (DGISP)

^bTomate/- = Tomate dont la variété n'est pas connue

^cAubergine/- = Aubergine dont la variété n'est pas connue

Matériel chimique et biologique

Deux milieux de cultures ont été utilisés : le milieu semi-sélectif pour *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (SCM) pour la culture de la bactérie et le milieu YDC (Yeast Dextrose Calcium carbonate agar) pour sa purification.

La souche de référence IPO 542 W27 a été fournie par le laboratoire de bactériologie de l'Institut Danois de Pathologie de Semences.

Méthodes de détection

Test sur symptômes de plantules

La méthode utilisée est celle décrite par SCHACKLETON (1962).

Cinq cents (500) graines de tomate ou d'aubergine sont placées sur deux à trois couches de papiers buvard humides dans des boîtes en plastique de dimensions internes 30 x 22 x 8 cm.

Les graines sont ensemencées sur les papiers buvard à raison de deux à cinq graines /cm² et incubées à la température de 28 à 30 °C dans une chambre de culture pendant 8 à 18 jours avec une alternance de 12 heures d'obscurité et de 12 heures de lumière blanche.

Les plantules montrant des décolorations jaunes, des parties turgescents, des brunissements de tiges et des racines sont sélectionnées et broyées dans de l'eau distillée salée (0,85 % de NaCl). Après 15mn, une goutte (≈50μl) du macérat est déposée sur le milieu de culture (SCM) dans une boîte de Pétri à l'aide d'une pipette Pasteur stérile.

La goutte est ensuite étalée sur trois secteurs de la boîte afin d'obtenir des colonies individuelles. La souche de référence est également étalée sur le même milieu (SCM). Incubées en position inversée de 25 à 30°C les boîtes de Pétri sont analysées pour la présence de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* après 7 à 9 jours d'incubation. Les colonies suspectes sont transférées sur le milieu King's B pour la purification en même temps que la souche de référence.

Des tests biochimiques, sérologiques, de pathogénie et d'hypersensibilité ont été utilisés pour identifier les colonies suspectes.

Test en milieu liquide

Le test en milieu liquide utilisé est décrit par MORTENSEN (1997).

Vingt quatre grammes de semence (approximativement 10 000 graines) sont placés dans un sachet en plastique de dimensions 20 cm x 25 cm et d'épaisseur 0,15 mm contenant 100 ml de tampon phosphate stérile et salé (PBS) et 0,02 ml de tween 20, pH 7, 4. A l'issue de 15 mn d'incubation à 4 °C le sachet est transféré dans un mixeur (stomacher) où les semences sont secouées pendant 15 mn.

Une série de trois dilutions (10⁻¹, 10⁻² et 10⁻³) est effectuée à partir de la suspension obtenue dans les sachets. De chaque dilution, y compris la suspension non diluée 50μl, sont pipetés et étalés à l'aide d'un étaloir dans trois boîtes de Pétri contenant le milieu de culture SCM. La bactérie de référence est cultivée sur le même milieu. Après incubation à 28-30 °C pendant 7 à 9 jours le nombre de colonies bactériennes formées par ml est évalué suivi du choix des colonies désignées comme pouvant être celles de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Ensemencement direct des graines

Cette méthode décrite par MORTENSEN (1997) consiste à placer 200 à 400 graines dans des boîtes de Pétri de diamètre 9 cm (25 graines par boîte soit 8 à 16 boîtes au total). Avant l'ensemencement les graines sont préalablement désinfectées par trempage dans une solution de NaOCl à 1 % pendant trois minutes. Après la désinfection, les graines sont lavées avec de l'eau distillée stérile. Les semences sont séchées à l'air et ensuite déposées sur le milieu de culture en

les pressant légèrement. Les boîtes de Pétri sont incubées entre 28 à 30 °C pendant 7 à 9 jours. Une souche de référence de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (IPO 542 W27) est également étalée sur le milieu de culture (SCM) pour la comparaison.

Les semences entourées de colonies bactériennes semblables à *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* sont identifiées. Ces colonies sont transférées (4 à 5 colonies) sur le milieu SCM par étalement à l'aide d'un manche Pasteur et les boîtes de Pétri incubées à 30 °C pendant 7 à 9 jours. La souche de référence est aussi étalée sur SCM. Les colonies de l'agent pathogène commencent à apparaître dès le 7^e jour d'incubation comme de petites colonies grises et rondes avec des centres tachetés qui évoluent avec l'âge.

Purification et identification des colonies isolées

Les colonies suspectes de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* sont purifiées sur le milieu de culture YDC (Yeast Dextrose Calcium carbonate agar). La souche de référence, IPO 542 W27 est de nouveau utilisée sur le même milieu pour comparaison. L'identification des colonies bactériennes pures qui sont retenues est faite selon les schémas d'identification de FAHY et PERSLEY (1983) et de LELLIOT et STEAD (1987). Les colonies de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* sur milieu YDC apparaissent jaune orange et sont moins visqueuses.

Les caractéristiques morphologiques des colonies des bactéries isolées (élévation, apparence, forme, couleur) sont notées. Des tests biochimiques standard sont utilisés : réaction de GRAM (test de solubilité dans l'hydroxyde de potassium à 3 % (LELLIOT et STEAD 1987) ; test de fluorescence sur milieu King's B (KING *et al.*, 1954) ; test d'oxydase de Kovac's (KOVACS'S, 1956 ; HILDEBRAND et SCHROTH, 1972) ; test d'hydrolyse de la gélatine (LELLIOT et STEAD (1987) ; test d'Oxydation/Fermentation (O/F), (HUGH et LEIFSON, 1953) ; tests sérologiques (Agadia DAS-ELISA Kit).

Le test d'hypersensibilité sur « 4 O' clock » (KLEMENT, 1983) et le test de pathogénie sur les feuilles de tomate et d'aubergine sont les tests d'inoculation utilisés pour l'identification de la bactérie.

Résultats

C. michiganensis subsp. *michiganensis* a été détecté dans cinq échantillons de semences (tableau II) par la méthode de détection en milieu liquide et sur le milieu de culture SCM. La bactérie n'a pas pu être détectée avec les deux autres méthodes (ensemencement direct sur milieu de culture et test sur symptômes de plantules). Les résultats des différents tests sélectionnés pour la caractérisation de la bactérie sont indiqués dans le tableau II.

A partir du 7^e jour et sur le milieu de culture SCM, on a observé des petites colonies grises qui grandissent avec le temps, présentant un centre craquant. Elles sont molles, brillantes, rondes et se développent lentement. Les isolats sont fluorescents sur le milieu King's B, GRAM positif et oxydase négatif. La gélatine est faiblement hydrolysée mais ils donnent un test d'ELISA positif (Agadia DAS-ELISA Kit). Ils provoquent la réaction d'hypersensibilité sur « 4 O' clock » après 24 à 48 h d'inoculation avec une suspension de 10⁶ bactéries/ml. Sur les plantules de tomate inoculées, les cotylédons flétrissent entre 4 à 7 jours.

Tableau II. Tests sélectionnés pour l'identification de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

^a N° d'accèsion (DGISP)	GRAM (KOH 3 %)	Oxydase	O/F	HG	H	ELISA	Pathogénie sur tomate	Bactérie isolée
39633	+	-	+/-	faible	+	+	+	C. m.m
40628	+	-	+/-	faible	+	faible	+	C. m.m
40629	+	-	+/-	faible	+	faible	+	C. m.m
40631	+	-	+/-	faible	+	+	+	C. m.m
40644	+	-	+/-	faible	+	+	+	C. m.m

O/F = Oxydation/Fermentation ; HG = hydrolyse de la gélatine ; H = Hypersensibilité

C. m.m. = *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

^aNuméro d'accèsion des échantillons déposés à l'Institut Danois de Pathologie des Semences pour les Pays en Voie de Développement (DGISP).

+ = Positif

- = Négatif

+/- = positif/négatif

Le nombre de colonies formées par millilitre sur le milieu SCM dépend de l'échantillon et a varié de $3,0 \cdot 10^4$ à $8,0 \cdot 10^4$ (tableau III). Il donne une estimation de la population bactérienne par millilitre de la suspension non diluée obtenue par échantillon.

Tableau III. Unités formant colonie /ml de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* sur SCM.

N° d'accèsion (DGISP)	Lieu de la culture	Espèce	Clavibacter <i>michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i>	Ufc/ml
39633	Badara	Aubergine	+	$4,2 \times 10^4$
40628	Léguema	Tomate	+	$8,0 \times 10^4$
40629	Léguema	Tomate	+	$4,6 \times 10^4$
40644	Léguema	Aubergine	+	$6,6 \times 10^4$
40631	Léguema	Aubergine	+	$3,0 \times 10^4$

Ucf : Unité formant colonie

+ : Positif

Discussion

L'agent pathogène a été détecté dans 23,8 % d'échantillons de semences de tomate et d'aubergine du Burkina Faso testés par la méthode d'extraction en milieu liquide. Les échantillons de semences de tomate étaient plus infectés (27,3 %) que ceux de l'aubergine (20 %). Ces niveaux d'infection des semences sont élevés. Des pourcentages d'infections encore plus élevés (33 %) ont été obtenus par NANCY (1994) sur des échantillons de semences de la tomate en provenance de Tanzanie. Ainsi, dans ces deux pays d'importantes pertes économiques peuvent être causées par la bactérie. En effet, des exemples sur certaines bactérioses montrent que même de très faibles niveaux d'infection de semences conduisent à des dégâts importants. Par exemple, WALKER et PATEL (1964) ont démontré que 0,02 % de semences infectées (12 graines pour un demi hectare) pourrait provoquer une épidémie de *Pseudomonas phaseolicola*, agent responsable de la tache auréolée du haricot. GUTHRIE *et al.* (1965) indiquent qu'une infection initiale d'une graine de haricot pour 16 000 pourrait conduire à une perte totale de la culture. TRIGALET et BIDAUD (1978) ont testé des semences de haricot et ont établi un niveau de tolérance d'une graine infectée pour 20 000 pour contrôler la maladie de la tache auréolée du haricot en France.

Le nombre d'unités formant colonies (Ufc/ml) qui donne le nombre de colonies bactériennes formées à partir d'un millilitre de la suspension non diluée a été calculé sur le milieu SCM. Il a varié de $3,0 \cdot 10^4$ à $8,0 \cdot 10^4$ (tableau II) et indique que les densités des bactéries sont fortes sur les semences de l'Ouest du Burkina Faso.

C. michiganensis subsp. *michiganensis* n'a pas pu être détecté ni par la méthode d'ensemencement direct sur milieu de culture ni par le test sur symptômes de plantules.

Ces deux dernières méthodes sont moins efficaces pour la détection de la bactérie comparative-ment au test en milieu liquide.

En effet le test sur symptômes de plantules présente certains inconvénients comme l'ont montré certains auteurs (BRYAN, 1930 ; STRIDER, 1969). Les résultats obtenus à partir de ce test sont irréguliers. Les plantules peuvent ne pas développer des symptômes (GROGAN et KENDRICK, 1953) ; et même si ils les développent, les symptômes ne se manifestent pas clairement avant la transplantation et avant une très longue période de temps de latence (THYR, 1969). De plus, il n'est pas toujours possible d'identifier la bactérie sur la base des symptômes observés. L'identification au laboratoire reste donc indispensable pour un diagnostic correct. Pour la plupart des laboratoires, il n'y a pas suffisamment de temps ni d'espace nécessaires pour conduire ce test sur un grand nombre de lots de semences ou de plants.

L'ensemencement direct sur milieu de culture présente également des inconvénients. Les semences sont toujours envahies par des bactéries saprophytes si le milieu n'est pas suffisamment sélectif. La détection de la bactérie recherchée devient plus difficile surtout lorsque les semences n'ont pas préalablement été désinfectées en surface (MORTENSEN, 1997). Comme le test sur symptômes de plantules, l'ensemencement direct sur milieu de culture est laborieux et prend beaucoup plus de temps que le test en milieu liquide.

Les résultats ont montré que le niveau d'infestation des semences est très élevé au Burkina Faso. Ceci constitue un danger permanent quant à l'avenir de ces cultures. Il est donc recommandé

de procéder à un traitement systématique des semences avant les semis pour prévenir une explosion éventuelle des agents pathogènes impliqués.

Références citées

- BRYAN M. K., 1930.** Studies of bacterial canker of tomato. J. Agr. Res, 4 : 825-851.
- COOK A. A., LARSON R. H. and WALKER J.C., 1952.** Relation of the black rot pathogen to cabbage seed. Phytopathology, 42 : 316-320.
- FAHY P.C. and PERSLEY G. J., 1983.** Plant bacterial diseases : A diagnostic Guide. Academic Press, London, UK. 393 p.
- FATMI M., SCHAAD N. W. and BOLKAN H. A., 1991.** Seed treatment for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from naturally infected tomato seeds. Plant Disease, 75 : 383-385.
- GITAITIS R. D., BEAVER R.W. and VOLOUDAKIS A.E., 1991.** Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. Plant Disease, 75 : 834-838.
- GITAITIS R.D., 1993.** Bacterial canker. In : Compendium of tomato diseases. APS Press, Georgia, Tifton, p. 25-26.
- GUTHRIE J. W., HUBER D. M. and FENWICK H. S., 1965.** Serological detection of halo blight. Plant Disease Reporter, 49 : 297-299.
- GROGAN R.G. and KENDRICK J.B., 1953.** Seed transmission, mode of overwintering and spread of bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. Phytopathology, 43 : 473.
- HILDEBRAND C. and SCHROTH M. N., 1972.** Identification of the fluorescent *Pseudomonas*. In : Proceedings of the 3rd Int. Conf. on plant pathogenic bacteria. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, p. 281-287.
- HUGH R. and LEIFSON E., 1953.** The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. Journal of Bacteriology, 66 : 24-6.
- KING E.O., WARD M. K. and RANEY D. E., 1954.** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. Journal of Laboratory Clinical Medicine, 44 : 301-307.
- KLEMENT Z., 1983.** Detection of seed-borne bacteria by hypersensitive reaction. Seed Science and Technology, 11 : 589-593.
- KOVAC' S N., 1956.** Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, 178 : 703.
- LELLIOT R. and STEAD D. E., 1987.** Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Scientific Publications. London, 216 p.
- MORTENSEN C.N., 1997.** Seed health testing for bacterial pathogen Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries (DGISP) Thorvaldsensvej 57 DK-1871 Frederiksberg C, Denmark, 67 p.
- NANCY A. K., 1994.** Detection of seed borne bacterial pathogens in tomato seeds of Tanzania. Horticultural Research and Training Institute, Tengeru, Arusha Tanzania, 31 p.
- OEPP/EPP0. 1992a.** Quarantine Pests for Europe. Data Sheets on quarantine Pests, CABI Int., p. 701-705.
- RAT B., 1984.** *Corynebacterium michiganense*. Technique de détection dans les semences de la tomate. In : Report on the 1st Int. Workshop on Seed Bacteriology, 4-9 Oct.1982, Angers France, p. 35-37.
- RAT B., POISSONIER J., GOISQUE M.J. et BURGAUD A., 1991.** Le point sur le chancre bactérien. Fruits et Légumes, 86 : 38-40.
- SCHACKLETON D. A., 1962.** A method for *Xanthomonas campestris* in brassica seed. Nature, 193 : 78.
- SCHAAD N. W., SITTERLY W. R. and HUMAYDAN H., 1980.** Relationship of incidence of seedborne *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* to black rot of crucifers in the field. Plant Disease, 64 : 91-92.

SHERF A.F. and MACNAB A., 1986. Vegetable diseases and their control. 2nd ed., A WILEY&SONS, Interscience Publication, UK, 728 p.

STRIDER D.L., 1969. Foliage blight phase of bacterial canker of tomato and survival of *Corynebacterium michiganense* in toxicants and in air dried condition. Plant Disease Reporter, 53 : 864-868.

THYR B. D., 1969. Assaying tomato seed for *Corynebacterium michiganense*. Plant Disease Reporter, 53 : 858-860.

TRIGALET A. and BIDAUD P., 1978. Some aspects of epidemiology of bean halo blight. In : Proceeding of the Fourth International Conference of Plant Pathogenic bacteria, Angers, France, p. 895-902.

WALKER J. C. and PATEL P. N., 1964. Splash dispersal and wind as factors in epidemiology of halo blight of bean. Phytopathology, 54 : 140-141.