

## NIMP 27

# Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés

## PD 6 : *Xanthomonas citri* sous-esp. *citri*

Adopté en 2014; publié en 2016

### TABLE DES MATIÈRES

1.	Informations sur l'organisme nuisible.....	2
2.	Données taxonomiques.....	2
3.	Détection.....	3
3.1	Détection dans des végétaux symptomatiques.....	3
3.1.1	Symptômes.....	3
3.1.2	Isolement.....	4
3.1.3	Détection sérologique: Immunofluorescence indirecte.....	4
3.1.4	Détection moléculaire.....	5
3.1.4.1	Témoins à utiliser en analyse moléculaire.....	5
3.1.4.2	Extraction d'ADN à partir de tissu d'agrumes.....	6
3.1.4.3	PCR classique.....	7
3.1.4.4	PCR en temps réel.....	8
3.1.5	Interprétation des résultats de la PCR classique et de la PCR en temps réel.....	8
3.1.6	Détection par tests biologiques.....	9
3.1.6.1	Inoculation dans des disques de feuilles.....	9
3.1.6.2	Enrichissement de feuilles machées.....	9
3.2	Détection dans les végétaux asymptomatiques.....	10
4.	Identification.....	10
4.1	Méthodes PCR.....	11
4.2	Détection sérologique.....	12
4.2.1	ELISA direct.....	12
4.2.2	ELISA indirect.....	13
4.3	Analyse de la pathogénicité.....	13
4.4	Description et caractéristiques biochimiques.....	14
4.5	Identification moléculaire.....	14
4.5.1	Analyse de séquence multilocus.....	14
4.5.2	Prise d'empreinte génétique par rep-PCR.....	15
5.	Données à conserver.....	15
6.	Points de contact pour tout complément d'information.....	15
7.	Remerciements.....	16
8.	Références.....	16
9.	Figures.....	20

## 1. Informations sur l'organisme nuisible

*Xanthomonas citri* sous-esp. *citri* est le principal agent du chancre bactérien des agrumes. Il provoque des dégâts sur de nombreuses espèces de Rutaceae (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (OEPP), 1979) – principalement *Citrus* spp., *Fortunella* spp. et *Poncirus* spp. – cultivées dans les conditions tropicales et subtropicales qui sont présentes dans de nombreux pays d'Asie, d'Amérique du Sud, d'Océanie et d'Afrique, ainsi qu'aux États-Unis, en Floride (CAB International), 2006; OEPP, 2006). Des souches atypiques de *X. citri* sous-esp. *citri* possédant un spectre de plantes hôtes plus restreint ont été identifiées et ont été désignées sous les noms de souche A\* et souche A<sup>w</sup> (Sun *et al.*, 2004; Vernière *et al.*, 1998). La souche A\* infecte *Citrus aurantiifolia* (limettier mexicain) en Asie dans des conditions naturelles. La souche A<sup>w</sup> provoque le chancre chez *Citrus aurantiifolia* (limettier mexicain) et *Citrus macrophylla* (Alemou) en Floride, aux États-Unis, dans des conditions naturelles (Cubero et Graham, 2002, 2004). Il a été signalé que ces deux souches provoquaient des lésions atypiques sur d'autres espèces d'agrumes dans des conditions expérimentales (Escalon *et al.*, 2013).

Le chancre citrique s'attaque en général aux plants, aux jeunes arbres et aux arbres adultes des hôtes sensibles, lesquels produisent des feuilles et des pousses en croissance active de la fin de l'été jusqu'à l'automne dans la plupart des zones de culture d'agrumes. Les lésions du chancre se forment sur les feuilles, les pousses, les rameaux et les fruits des hôtes sensibles. Les blessures causées par le vent, les épines et les insectes et tout dégât physique ou mécanique facilitent l'infection des tissus matures. Les attaques de *Phyllocnistis citrella*, la mineuse des agrumes, peuvent accroître la sensibilité des feuilles au chancre (Hall *et al.*, 2010).

*X. citri* sous-esp. *citri* peut survivre dans des tissus végétaux malades et aussi en tant qu'épiphyte dans des plantes hôtes et non hôtes et en tant que saprophyte dans du pommis ou dans le sol. Cependant, les lésions d'hivernation, en particulier les lésions présentes sur les pousses anguleuses, constituent les principales sources d'inoculum à la saison suivante. Les mécanismes essentiels de dissémination sur de faibles distances sont les gouttes de pluie et les éclaboussures véhiculées par le vent sur le même arbre ou entre arbres: les bactéries sont transportées par l'eau de pluie qui ruisselle sur la surface de lésions puis éclabousse des pousses saines (CAB International, 2006). Le déplacement de matériel végétal infecté (notamment greffons, plantules et porte-greffes ou arbres de pépinière greffés) a joué un rôle dans la dissémination sur de grandes distances. La dissémination du pathogène par les semences n'a jamais été démontrée (CAB International, 2006).

## 2. Données taxonomiques

**Nom:** *Xanthomonas citri* sous-esp. *citri* (Gabriel *et al.* 1989) Schaad *et al.* 2007

**Synonymes:** *Xanthomonas smithii* sous-esp. *citri* Gabriel *et al.*, 1989, Schaad *et al.*, 2007

*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) Vauterin *et al.*, 1995

*Xanthomonas citri* (ex Hasse, 1915) Gabriel *et al.*, 1989

*Xanthomonas campestris* pv. *aurantifolii* Gabriel *et al.*, 1989

*Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye, 1978

*Xanthomonas citri* f.sp. *aurantifoliae* Namekata et Oliveira, 1972

*Pseudomonas citri* Hasse, 1915

**Classement taxonomique:** Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Xanthomonadales, Xanthomonadaceae

**Noms communs:** chancre citrique, chancre bactérien des agrumes, chancre asiatique des agrumes

**Note:** Le nom *X. citri* sous-esp. *citri* résulte d'un reclassement récent de *X. axonopodis* pv. *citri* (groupe des souches A de *X. campestris* pv. *citri*). La nomenclature de Gabriel *et al.* (1989) a été rétablie et le nom accepté de l'agent pathogène du chancre bactérien des agrumes est maintenant *X. citri* sous-esp. *citri* (Bull *et al.*, 2010; Schaad *et al.*, 2006). Les autres groupes de souches de *X. campestris* pv. *citri* ont été reclassés en *Xanthomonas fuscans* sous-esp. *aurantifolii* (groupes B, C et D) et *Xanthomonas alfalfae* sous-esp. *citrumelonis* (groupe E) (Schaad *et al.*, 2006).

### 3. Détection

#### 3.1 Détection dans des végétaux symptomatiques

Le diagnostic du chancre des agrumes peut être effectué par observation des caractéristiques morphologiques des colonies sur milieu nutritif et par analyse sérologique (immunofluorescence [IMF]), analyse moléculaire (amplification en chaîne par polymérase [polymerase chain reaction – PCR]) et test biologique sur disques de feuilles ou feuilles détachées. Toutes les analyses doivent inclure des témoins positifs et négatifs (voir la section 4 en ce qui concerne le témoin de référence).

##### 3.1.1 Symptômes

La maladie est caractérisée par l'apparition de galles ou de lésions cratériformes sur l'écorce des fruits et sur les feuilles, les tiges et les jeunes pousses. Les symptômes du chancre des agrumes peuvent apparaître en toutes saisons sur les jeunes plants et de la fin de l'été jusqu'à l'automne sur les jeunes arbres, car c'est la période durant laquelle ceux-ci produisent en abondance de nouvelles pousses anguleuses (CAB International, 2006) (figures 1 à 4). La maladie est sporadique quand les arbres atteignent pleinement le stade de fructification car, d'une part, ils produisent moins de pousses anguleuses et, d'autre part, le tissu des feuilles plus âgées et les fruits mûrs résistent mieux au chancre des agrumes dans des conditions naturelles. La gravité de l'infection tient aussi au degré de sensibilité des espèces et des cultivars de végétaux hôtes (Goto, 1992).

*Symptômes sur les fruits.* Des lésions cratériformes se développent sur la surface des fruits; les lésions peuvent être isolées et dispersées sur le fruit ou bien être fusionnées en formes irrégulières. Une exsudation de substances résineuses peut être observée sur les jeunes fruits infectés. Les lésions ne pénètrent jamais en-dessous des tissus superficiels de l'écorce.

*Symptômes sur les rameaux.* Quand il fait sec, la lésion est subéreuse ou spongieuse, surélevée, et sa surface est ouverte. Quand il fait humide, la lésion s'étend rapidement et sa surface reste non ouverte avec une bordure baveuse. Sur les cultivars moins sensibles, une couche calleuse peut se former entre les tissus infectés et les tissus sains. On peut identifier la cicatrice du chancre en grattant la surface croûteuse avec un couteau pour éliminer la couche subéreuse extérieure, ce qui fait apparaître des lésions brun clair à brun foncé sur les tissus verts sains de l'écorce. La zone ayant une coloration anormale peut varier en forme et en taille, allant de 5 à 10 mm, selon le degré de sensibilité de la plante hôte.

*Symptômes sur les feuilles.* On voit apparaître, d'abord des tâches jaune vif sur la face inférieure du limbe, puis des lésions brunâtres éruptives, qui deviennent rugueuses, craquelées et subéreuses, sur les deux faces de la feuille. Le chancre peut être entouré d'un halo jaune ou chlorosé imbibé d'eau.

Il est possible de confondre les symptômes du chancre citrique sur les rameaux, les feuilles et les fruits avec les galles et les taches sur les feuilles dont l'apparition est provoquée par d'autres bactéries et champignons qui infectent les agrumes ou par divers troubles physiologiques. Les autres bactéries susceptibles de provoquer des symptômes semblables à ceux du chancre des agrumes sont *X. alfalfae* sous-esp. *citrumelonis* et *X. fuscans* sous-esp. *aurantifolii*. Ces deux bactéries possèdent un spectre d'hôtes limité, donnent lieu à des symptômes moins agressifs et produisent rarement des lésions sur les fruits (Schaad *et al.*, 2005, 2006). Il a été signalé que la galle commune des agrumes imputable au champignon *Elsinoë fawcettii* provoquait des symptômes identiques à ceux du chancre citrique, en particulier chez les variétés d'hôtes présentant une résistance à la galle commune (Taylor *et al.*, 2002) mais, en général, les lésions sont plus sèches et plus irrégulières que celles du chancre et ne sont pas

toujours entourées du halo jaune caractéristique. L'absence d'exsudat bactérien permet de distinguer la galle commune des agrumes du chancre bactérien des agrumes.

### 3.1.2 Isolement

Il est essentiel de disposer d'échantillons fraîchement préparés pour parvenir à isoler *X. citri* sous-esp. *citri* à partir de matériel végétal symptomatique. Le matériel végétal devrait être analysé aussi rapidement que possible après son prélèvement; il peut être stocké à une température de 4 à 8 °C jusqu'au moment du traitement. Quand les symptômes sont très avancés ou quand les conditions environnementales ne sont pas favorables, le nombre de cellules cultivables de *X. citri* sous-esp. *citri* peut être très faible et l'isolement aboutir à des cultures qui pullulent de bactéries saprophytes ou antagonistes concurrentes. Il convient de faire attention à ne pas confondre les colonies de *X. citri* sous-esp. *citri* avec celles de *Pantoea agglomerans*, un organisme qui est aussi couramment isolé à partir de lésions de chancre et qui produit des colonies morphologiquement identiques sur un milieu nutritif bactériologique normal. En général, *P. agglomerans* se développe plus rapidement et ses colonies sont d'un jaune plus vif que le jaune pâle/jaune citron des colonies de *X. citri* sous-esp. *citri*.

On peut procéder à l'isolement de l'agent causal en déposant en stries des extraits de lésions sur des plaques d'un milieu adapté, sur lequel les colonies de *X. citri* sous-esp. *citri* revêtent une apparence caractéristique. À l'heure actuelle, il n'existe pas de milieu strictement sélectif pour *X. citri* sous-esp. *citri*.

Les lésions sont mises à macérer dans 0,5 à 1,0 ml de solution saline (solution d'eau stérile distillée et de chlorure de sodium (NaCl) à 0,85 pour cent, pH 7,0) après avoir été, si nécessaire, désinfectées avec de l'hypochlorite de sodium (NaClO) à 1 pour cent pendant 1 minute, rincées trois fois à l'eau distillée stérile puis pulvérisées. Une partie aliquote de l'extrait est déposée en stries sur du milieu nutritif. Les milieux d'isolement généraux comprennent la gélose nutritive additionnée de glucose à 0,1 pour cent (NGA), de la gélose avec extrait de levure, peptone et glucose (YPGA) (extrait de levure, 5 g; Bacto Peptone, 5 g; glucose, 10 g; gélose, 10 g; eau distillée, 1 litre; pH 7,0) et le milieu de Wakimoto (bouillon de pomme de terre, 250 ml; sacrose, 15 g; peptone, 5 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 0,8 g; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0,5 g; Bacto™ Agar, 10 g; eau distillée, 1 litre; pH 7,2). Si nécessaire, on peut ajouter de la cycloheximide stérilisée par filtration (100 mg/litre) en tant que fongicide après avoir passé le milieu à l'autoclave.

Sur les trois milieux, les colonies sont circulaires, convexes à bord régulier, mucoides et d'un jaune crémeux (caractères morphologiques). La croissance est évaluée après incubation à 25–28 °C pendant trois à cinq jours. Dans les échantillons de fruits commerciaux, les bactéries peuvent être stressées et difficiles à cultiver; c'est pourquoi il peut être nécessaire de prolonger l'incubation ou de recourir à des tests biologiques pour récupérer la bactérie dans les échantillons, selon la méthode décrite dans la section 2.1.6.2. Le ajout de kanamycine et de céphalexine dans le milieu (milieu semi-sélectif KC ou KCB) inhibe la croissance de plusieurs bactéries saprophytes et facilite l'isolement du pathogène (Graham *et al.*, 1989; Pruvost *et al.*, 2005).

Dans le présent protocole de diagnostic, les méthodes (et notamment la mention de noms commerciaux) sont indiquées telles que publiées, car ce sont elles qui définissent le degré de sensibilité, la spécificité et/ou la reproductibilité initialement obtenus. La mention de noms de produits chimiques (par exemple la marque) n'implique aucune approbation de ceux-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Les procédures de laboratoire présentées dans les protocoles peuvent être adaptées aux normes de chaque laboratoire, à condition qu'elles soient validées de manière adéquate.

### 3.1.3 Détection sérologique: Immunofluorescence indirecte

Lorsque l'on procède à une détection sérologique (immunofluorescence [IMF] ou analyse par dosage immunoenzymatique ELISA [enzyme-linked immunosorbent assay]), il est essentiel de disposer de témoins permettant de garantir la fiabilité des résultats. Chaque essai devrait inclure un témoin positif et un témoin négatif. Les échantillons témoins positifs peuvent être obtenus en remettant en

suspension une souche de *X. citri* sous-esp. *citri* de référence dans de l'extrait de plante hôte saine (s'agissant de la détection dans du matériel végétal) ou dans du tampon phosphate salin (PBS) (s'agissant de l'identification de cultures bactériennes). Les échantillons témoins négatifs devraient consister en un extrait de plante hôte saine (s'agissant de la détection dans du matériel végétal) ou en une suspension d'espèces bactériennes non ciblées (s'agissant de l'identification de cultures bactériennes).

Pour procéder à une détection sérologique de cellules bactériennes, prélever sur la plaque une anse de cultures fraîches et remettre celles-ci en suspension dans 1 ml de PBS (NaCl, 8 g; KCl, 0,2 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 2,9 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g; eau distillée pour atteindre 1 litre; pH 7,2) afin d'obtenir approximativement 10<sup>8</sup> unités formant colonie (ufc)/ml (OEPP, 2009).

Pour procéder à une détection sérologique dans du tissu végétal, des échantillons porteurs de symptômes – pousses, rameaux, feuilles et fruits présentant tous des lésions nécrotiques ou bien tissu de chancres provenant de rameaux, de branches, du tronc ou du collet – devraient être choisis. Les échantillons devraient être préparés conformément à la procédure générale recommandée pour le test sérologique spécifique à réaliser. En général, le tissu végétal est broyé dans un tampon de macération antioxydant fraîchement préparé (polyvinylpyrrolidone (PVP)-10, 20 g; mannitol, 10 g; acide ascorbique, 1,76 g; glutathion réduit, 3 g; PBS, 10 mM, 1 litre; pH 7,2) ou dans du PBS (NaCl, 8 g; KCl, 0,2 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 2,9 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g; eau distillée pour atteindre 1 litre; pH 7,2), avant d'être soumis à des tests sérologiques. Les deux solutions sont stérilisées par filtration au moyen d'une membrane stérile dont la taille des pores est de 0,22 µm.

Des parties aliquotes de 25 µl de chaque préparation bactérienne ou échantillon végétal à analyser sont déposées à l'aide d'une pipette sur une lame de microscope multiple plastifiée, mises à sécher à l'air libre puis délicatement fixées à la chaleur au-dessus d'une flamme. Des lames séparées sont préparées pour chaque suspension bactérienne ou échantillon végétal d'analyse et aussi pour les témoins positifs et négatifs tels que ceux que l'on utilise dans le test ELISA. Des antisérums ou des anticorps monoclonaux du commerce sont dilués dans du PBS (pH 7,2) et 25 µl des dilutions qui conviennent sont ajoutés dans les puits de chaque lame. Les témoins négatifs peuvent consister en sérum normal (pré-immun) à une dilution et en PBS. Les lames sont mises à incuber dans une chambre humide à température ambiante pendant 30 minutes. Elles sont ensuite secouées pour éliminer les gouttelettes, rincées avec du PBS puis lavées trois fois avec du PBS pendant 5 minutes chaque fois. Après avoir séché complètement les lames avec précaution à l'aide d'un papier absorbant, on verse dans chaque puits à l'aide d'une pipette 25 µl de la gamma globuline anti-espèces appropriée conjuguée à de l'isothiocyanate de fluoresceïne (ITCF) à la dilution qui convient. Les lames sont incubées dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes, rincées, lavées et séchées complètement à l'aide d'un papier absorbant. Enfin, on verse 10 µl de glycérine tamponnée au phosphate (0,1 mm/litre) (pH 7,6) adoucie d'un agent antidécoloration dans chaque puits avant de le couvrir d'une lamelle.

Les lames sont examinées sous de l'huile à immersion avec un microscope à fluorescence de grossissement 600× ou 1 000×. L'ITCF émet une fluorescence d'un vert vif à la lumière ultraviolette du microscope. Si le témoin positif contenant une bactérie connue montre des cellules bactériennes en bâtonnet fluorescentes et si les témoins négatifs consistant en sérum normal et PBS n'émettent pas de fluorescence, on examine les puits contenant les échantillons pour détecter la présence de cellules bactériennes fluorescentes ayant la taille et la forme de *X. citri* sous-esp. *citri*. Cette méthode permet une détection de 10<sup>3</sup> ufc/ml environ.

### 3.1.4 Détection moléculaire

#### 3.1.4.1 Témoins à utiliser en analyse moléculaire

Pour que les résultats d'un test soient jugés fiables, il est essentiel d'utiliser des témoins appropriés – qui dépendront du type de test utilisé et du degré de certitude souhaité. Lorsque l'on procède à une PCR, il faut utiliser au minimum un acide nucléique témoin positif, un témoin interne et un témoin

d'amplification négatif («no template control»). Les témoins, y compris les témoins susmentionnés, qu'il faudrait envisager d'utiliser pour chaque série d'extractions d'acide nucléique à partir de vos échantillons d'analyse sont décrits ci-dessous.

**Acide nucléique témoin positif.** Un acide nucléique déjà préparé (conservé), l'ADN d'un génome entier ou un témoin de synthèse (par exemple, un produit PCR cloné) peut servir de témoin pour contrôler l'efficacité de l'amplification PCR.

**Témoins internes.** En ce qui concerne la PCR classique et en temps réel, un gène domestique végétal, tel que COX (Weller *et al.*, 2000), l'ADN ribosomique (ADNr) 16S (Weisberg *et al.*, 1991) ou GADPH (Mafra *et al.*, 2012), devrait être intégré dans le protocole de la PCR en tant que témoin, de manière à éliminer la possibilité de faux négatifs dus à l'échec de l'extraction, à la dégradation de l'acide nucléique ou à la présence d'inhibiteurs de PCR.

**Témoin d'amplification négatif (no template control).** En ce qui concerne la PCR classique et en temps réel, de l'eau de qualité PCR ayant été utilisée dans le mélange réactionnel est ajoutée à l'étape de l'amplification afin d'éliminer la possibilité de faux positifs dus à une contamination lors de la préparation du mélange réactionnel.

**Témoin d'extraction positif.** Ce témoin sert à vérifier que la qualité de l'acide nucléique de la cible est suffisante pour permettre une amplification PCR. L'acide nucléique est extrait du tissu d'un hôte infecté ou du tissu d'une plante saine où l'on a ajouté la cible à la concentration considérée comme étant le seuil de détection du protocole.

Le témoin positif devrait consister approximativement en un dixième de la quantité de tissu de feuille utilisée par végétal pour extraire l'ADN. Lorsque l'on effectue une PCR, il faut faire attention à éviter toute contamination croisée due à des particules en suspension dans l'air provenant du témoin positif ou des échantillons positifs. Si nécessaire, le témoin positif utilisé dans le laboratoire devrait être séquencé afin que l'on puisse facilement comparer sa séquence à celles qui sont obtenues à partir des amplicons PCR de la taille correcte. Une variante consiste à fabriquer des témoins positifs de synthèse avec une séquence connue qui, encore une fois, peut être comparée à celles des amplicons PCR de la taille appropriée.

**Témoin d'extraction négatif.** Ce témoin sert à contrôler la contamination pendant l'extraction de l'acide nucléique et la réaction croisée du tissu de l'hôte. Le témoin consiste en acide nucléique extrait de tissu d'hôte non infecté, qui a ensuite été amplifié. Il est recommandé d'utiliser de multiples témoins quand l'analyse porte sur un grand nombre d'échantillons positifs.

### 3.1.4.2 Extraction d'ADN à partir de tissu d'agrumes infectés

L'extraction d'ADN à partir de tissu d'agrumes infectés a été réalisée pour la première fois par Hartung *et al.* (1993) selon un protocole fondé sur l'emploi de bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB), mais des méthodes commerciales et un protocole reposant sur l'emploi d'isopropanol (ne nécessitant pas de phénol) ont fait l'objet de nombreuses évaluations (Llop *et al.*, 1999). De l'ADN a aussi pu être extrait à partir de tissu d'agrumes au moyen de kits d'extraction d'ADN du commerce (par exemple, Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit) (Coletta-Filho *et al.*, 2006).

S'agissant du protocole employant l'isopropanol, des lésions ou du matériel végétal suspecté d'infection sont coupés en petits morceaux, recouverts de PBS et secoués dans un agitateur rotatif pendant 20 minutes à température ambiante. Le surnageant est filtré (pour éliminer le matériel végétal) puis centrifugé à 10 000 g pendant 20 minutes. Le culot est remis en suspension dans 1 ml de PBS: 500 µl sont mis de côté pour d'autres analyses ou un isolement direct sur plaques de gélose, et 500 µl sont centrifugés à 10 000 g pendant 10 minutes. Le culot est remis en suspension dans 500 µl de tampon d'extraction (200 mM de Tris-HCl, pH 7,5; 250 mM de NaCl; 25 mM d'éthylène diamine tétraacétique (EDTA); dodécylsulfate de sodium [SDS] à 5 pour cent; PVP à 2 pour cent), mélangé au vortex et agité en permanence pendant 1 heure à température ambiante. La suspension est ensuite centrifugée à 5 000 g pendant 5 minutes, puis 450 µl du surnageant sont transférés dans un nouveau

tube et mélangés à 450 µl d'isopropanol. La suspension est mélangée doucement et laissée pendant 1 heure à la température ambiante. La précipitation peut être facilitée par l'emploi du coprécipitant Pellet Paint (Cubero *et al.*, 2001). La suspension est centrifugée à 13 000 g pendant 10 minutes, le surnageant est éliminé et le culot est séché. Le culot est remis en suspension dans 100 µl d'eau. On utilise un échantillon de 5 µl dans une PCR de 50 µl.

### 3.1.4.3 PCR classique

Il existe plusieurs couples d'amorces pour le diagnostic de *X. citri* sous-esp. *citri*. Les amorces 2 et 3 de Hartung *et al.* (1993) ciblent un fragment d'ADN polymorphique en longueur des fragments de restriction *Bam*HI spécifique à *X. citri* sous-esp. *citri* et sont les plus fréquemment employées dans les analyses de matériel végétal en raison de leur spécificité et de leur bon niveau de sensibilité (environ 10<sup>2</sup> ufc/ml). Les amorces *J-pth1* et *J-pth2* ciblent un fragment de 197 paires de bases (pb) du signal de localisation nucléaire dans le gène de virulence *pthA* des souches de *Xanthomonas* qui provoquent les symptômes du chancre des agrumes. Ces souches sont *X. citri* sous-esp. *citri*, *X. fuscans* sous-esp. *aurantifolii* et les souches atypiques A\* et A<sup>w</sup> de *X. citri* sous-esp. *citri* détectées en Floride (Cubero et Graham, 2002). Les amorces sont universelles mais ont un niveau de sensibilité (10<sup>2</sup> ufc/ml dans du matériel végétal) inférieur à celui des amorces de Hartung *et al.* (1993). Cependant, les amorces de Hartung ne permettent pas de détecter la souche A<sup>w</sup> de *X. citri* sous-esp. *citri* ni aucune des souches A\* ou *X. fuscans* sous-esp. *aurantifolii*. Dans les situations où la présence de souches atypiques A\* et A<sup>w</sup> de *X. citri* sous-esp. *citri* est suspectée – par exemple, quand les symptômes du chancre des agrumes sont observés sur *C. aurantiifolia* (mandarinier américain) et *C. macrophylla* (Alemow) – les deux séries d'amorces devraient être employées.

#### Protocole PCR de Hartung *et al.* (1993)

Les amorces sont les suivantes:

2 (antisens): 5'-CAC GGG TGC AAA AAA TC-3'

3 (sens): 5'-TGG TGT CGT CGC TGG TAT-3'.

Le mélange PCR, préparé dans un tube stérile, se compose de tampon PCR (50 mM de Tris-HCl, pH 9; 20 mM de NaCl; Triton X-100 à 1%; gélatine à 0,1%; 3 mM de MgCl<sub>2</sub>), 1 µM d'amorce 2 et 1 µM d'amorce 3, 0,2 mM de chaque désoxyribonucléotide triphosphate (dNTP) et de Taq DNA polymérase 1,25 U. Un volume de 5 µl d'échantillon d'ADN extrait est ajouté à 45 µl du mélange PCR pour donner un volume total de 50 µl par réaction. Les paramètres de la réaction sont les suivants: une phase initiale de dénaturation à 95 °C pendant 2 minutes suivie de 35 cycles à 95 °C pendant 60 secondes, 58 °C pendant 70 secondes et 72 °C pendant 75 secondes, et une phase finale d'élongation à 72 °C pendant 10 minutes. La taille de l'amplicon est de 222 pb.

#### Protocole PCR de Cubero et Graham (2002)

Les amorces sont les suivantes:

*J-pth1* (sens): 5'-CTT CAA CTC AAA CGCC GGA C-3'

*J-pth2* (antisens): 5'-CAT CGC GCT GTT CGG GAG-3'.

Le mélange PCR, préparé dans un tube stérile, se compose de 1× tampon Taq, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 µM de l'amorce *J-pth1* et 1 µM de l'amorce *J-pth2*, 0,2 mM de chaque de dNTP et de Taq DNA polymérase 1 U. Un volume de 2,5 µl d'échantillon d'ADN extrait est ajouté à 22,5 µl du mélange PCR pour donner un volume total de 25 µl par réaction. Les paramètres de la réaction sont les suivants: une phase initiale de dénaturation à 94 °C pendant 5 minutes suivie de 40 cycles à 93 °C pendant 30 secondes, 58 °C pendant 30 secondes et 72 °C pendant 45 secondes, et une phase finale d'élongation à 72 °C pendant 10 minutes. La taille de l'amplicon est de 198 pb.

Des techniques de PCR gigogne (nested PCR), immunocapture et détection colorimétrique de produits de PCR gigogne, pour la détection directe et sensible de *X. citri* sous-esp. *citri* dans des végétaux ont aussi été mises au point (Hartung *et al.*, 1993). Les niveaux de sensibilité des différents protocoles et

des différentes amorces, en ce qui concerne l'analyse de cultures pures et d'extraits de fruits, ont été comparés dans une publication (Golmohammadi *et al.*, 2007).

### 3.1.4.4 PCR en temps réel

Après l'extraction de l'ADN du matériel végétal conformément aux prescriptions du protocole de Llop *et al.* décrit plus haut (1999), le culot est remis en suspension dans 100 µl d'eau ultrapure stérile et est conservé à -20 °C jusqu'à utilisation.

Un couple d'amorces, *J-pth3* (5'-ACC GTC CCC TAC TTC AAC TCA A-3') et *J-pth4* (5'-CGC ACC TCG AAC GAT TGC-3'), et la sonde TaqMan correspondante (*J-Taqpth2*) (5'-ATG CGC CCA GCC CAA CGC-3') marquée à son extrémité 5' par de la 6-carboxyfluorescéine (FAM) et à son extrémité 3' par de la tétraméthylrhodamine, ont été conçus à partir de séquences du gène *pth*. L'un des principaux gènes de virulence utilisé dans d'autres études pour détecter spécifiquement des souches de *X. citri* sous-esp. *citri* (Cubero et Graham, 2002, 2005). Les souches concernées sont *X. citri* sous-esp. *citri*, *X. fuscans* sous-esp. *aurantifolii* et les souches atypiques A\* and A<sup>w</sup> de *X. citri* sous-esp. *citri* détectées en Floride.

Il est procédé à la PCR en temps réel en ajoutant 2 µl de l'ADN matrice à un mélange réactionnel contenant 12,5 µl de QuantiMix Easy Kit, qui se compose de QuantiMix Easy Master Mix et de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µl de 10 µM d'amorce sens (*J-RTpth3*), 1 µl de 10 µM d'amorce antisens (*J-RTpth4*), 0,5 µl de 10 µM de sonde TaqMan (*J-Taqpth2*) et de l'eau distillée stérile pour atteindre un volume réactionnel final de 25 µl. Le protocole de PCR en temps réel a été mis au point avec le système de détection de séquences ABI PRISM 7000 Sequence Detection System. D'autres matériels ont donné des résultats identiques (María Lopez, communication personnelle, 2013). Les paramètres d'amplification des amorces et des sondes sont les suivants: une phase initiale d'activation de 15 minutes à 95 °C, suivie de 40 cycles de 30 secondes à 95 °C et 1 minute à 60 °C. Un kit PCR en temps réel complet, qui est fondé sur l'application de ce protocole et comprend le mélange réactionnel et l'enzyme, est mis à disposition par PlantPrint Diagnostics (<http://www.plantprint.net>).

La PCR en temps réel est aussi spécifique que les amorces du gène *pth* employées dans la méthode de PCR classique (Cubero et Graham, 2002, 2005) et permet une détection fiable d'une concentration approximative de 10 ufc de *X. citri* sous-esp. *citri* provenant de lésions de feuilles infectées ou d'une dilution de cultures de cellules (Mansour *et al.*, 2004). Cette méthode a été récemment comparée à la PCR normale et à la PCR gigogne (Golmohammadi *et al.*, 2007) et la sensibilité de la détection de *X. citri* sous-esp. *citri* dans des lésions de fruits a été évaluée à 10 ufc/ml.

### 3.1.5 Interprétation des résultats de la PCR classique et de la PCR en temps réel

#### PCR classique

Pour être jugée valide, la PCR spécifique au pathogène devra satisfaire aux critères ci-après:

- le témoin positif produit un amplicon de la bonne taille pour la bactérie
- le témoin d'extraction négatif et le témoin d'amplification négatif ne produisent pas d'amplicon de la bonne taille pour la bactérie.

Si des amorces du témoin interne ADNr 16S sont aussi employées, alors le témoin négatif (tissu végétal sain), s'il est utilisé, le témoin positif et chacun des échantillons de l'analyse produiront une bande d'environ 1,6 kilobase (kb) (la taille de l'amplicon dépendra des amorces de l'ADNr 16S qui auront été employées (Weisberg *et al.*, 1991)). Il est à noter que les témoins positifs de synthèse et les témoins positifs consistant en plasmides ne produiront pas de bande de 1,6 kb. Si l'amplification des échantillons avec les amorces du témoin interne n'a pas lieu, on peut en conclure, par exemple, que l'extraction d'ADN n'a pas réussi, que l'acide nucléique n'a pas été ajouté dans le mélange réactionnel, que des composés inhibiteurs de PCR sont présents dans l'extrait d'ADN ou que l'ADN s'est détérioré.

Un échantillon sera considéré comme positif s'il produit un amplicon de la bonne taille.

### PCR en temps réel

Pour être jugée valide, la PCR en temps réel devra satisfaire aux critères ci-après:

- le témoin positif produit une courbe d'amplification avec les amorces spécifiques au pathogène
- le témoin d'extraction négatif et le témoin d'amplification négatif ne produisent pas de courbe d'amplification (c'est-à-dire que la valeur du cycle seuil (Ct) est égale à 40).

Si les amorces du témoin interne COX sont également employées, le témoin négatif (s'il est utilisé), le témoin positif et chacun des échantillons de l'analyse doivent produire une courbe d'amplification. Si les échantillons ne produisent pas de courbe d'amplification avec les amorces du témoin interne, on peut en conclure, par exemple, que l'extraction d'ADN a échoué, que l'ADN n'a pas été ajouté dans le mélange réactionnel, que des composés inhibiteurs de PCR sont présents dans l'extrait d'ADN ou que l'ADN s'est détérioré.

Un échantillon sera considéré comme positif s'il produit une courbe d'amplification caractéristique. La valeur limite du cycle seuil doit être vérifiée dans chaque laboratoire quand l'analyse est réalisée pour la première fois.

### 3.1.6 Détection par tests biologiques

#### 3.1.6.1 Inoculation dans des disques de feuilles

Dans ce test, des extraits d'échantillons infectés sont injectés dans du tissu de feuille d'agrumes sensible à *X. citri* sous-esp. *citri*. Le tissu est ensuite maintenu à l'incubation dans des conditions favorables à la multiplication bactérienne et à l'apparition de pustules au stade initial.

Le protocole de ce test biologique commence par la stérilisation de plaques ELISA pendant 15 minutes dans un four à micro-ondes. Puis, dans une chambre à flux laminaire à température ambiante, on verse dans les puits 200 µl d'eau stérile gélosée à 1,5 pour cent. De jeunes feuilles de *Citrus paradisi* var. Duncan (pomelo) ou d'autres hôtes sensibles, par exemple, *Citrus aurantifolia* (limettier mexicain) ou *Poncirus trifoliata* (oranger trifolié), sont désinfectées en surface pendant 1 minute avec une solution de NAO à 10 pour cent. Les feuilles devraient être entièrement développées mais ne pas être mures ou dures. Les feuilles sont rincées trois fois avec de l'eau distillée stérile puis séchées en surface dans une chambre à flux laminaire à température ambiante. Dans chaque puits, des disques de feuilles obtenus avec une perforatrice (désinfectée à l'éthanol à 95 pour cent) sont déposés, face adaxiale vers le bas, sur la solution gélosée. Cinquante microlitres de lésions de chancre des agrumes macérées (quatre puits de répétition pour chaque échantillon végétal) sont ajoutés.

Une suspension de  $10^5$  ufc/ml de *X. citri* sous-esp. *citri* constitue le témoin positif et une solution saline stérile le témoin négatif (quatre puits de répétition par témoin). Les plaques sont scellées (par exemple avec du parafilm) de manière à conserver une humidité relative de près de 100 pour cent, et mises à incuber à 28 °C pendant 12 jours sous éclairage permanent. Les progrès sont régulièrement suivis. La formation de pustules blanchâtres au stade initial est évaluée sur chacun des disques de feuille à partir du troisième jour, au moyen d'une microscopie stéréoscopique et de techniques d'isolement de *X. citri* sous-esp. *citri* telles que celles qui sont décrites à la section 3.1.2. Les disques asymptomatiques peuvent faire l'objet d'un examen plus approfondi visant la détection éventuelle de bactéries vivantes par isolement sur un milieu semi-sélectif (Verdier *et al.*, 2008). Après 12 jours, si *X. citri* sous-esp. *citri* est présent, les cellules bactériennes se sont multipliées sur le tissu végétal et peuvent être isolées sur un milieu nutritif en plus grands nombres. Ce test biologique constitue une méthode de diagnostic très spécifique et très sensible ( $10^2$  ufc/ml) (Verdier *et al.*, 2008).

#### 3.1.6.2 Enrichissement de feuilles détachées

Un enrichissement sélectif en *X. citri* sous-esp. *citri* peut aussi être réalisé par des feuilles détachées porteuses de lésions de *C. paradisi* var. Duncan (pomelo) ou d'autres hôtes particulièrement sensibles, par exemple, *C. aurantifolia* (limettier mexicain) ou *P. trifoliata* (oranger trifolié). De jeunes feuilles terminales de végétaux cultivés sous serre sont lavées pendant 10 minutes à l'eau courante du robinet,

désinfectées en surface pendant 1 minute avec une solution de NACIO à 1 pour cent et soigneusement rincées dans des conditions aseptiques avec de l'eau distillée stérile. On provoque des lésions dans des conditions aseptiques sur la face inférieure de chaque feuille en la piquant avec une aiguille ou en pratiquant de petites entailles avec un scalpel et on place les feuilles entières, face inférieure vers le haut, dans les puits des plaques ELISA sur de l'eau stérile gélosée à 1 pour cent. Des gouttelettes de 10 à 20 µl de lésions de chancre des agrumes macérées sont déposées dans les blessures. Les témoins positifs et négatifs employés sont les mêmes que ceux du test biologique sur disques de feuilles. Après 4 à 12 jours à 25 °C dans un incubateur éclairé, l'apparition de pustules est évaluée et *X. citri* sous-esp. *citri* peut être isolé, soit à partir de pustules, soit à partir de tissu de feuilles porteuses de lésions asymptomatiques, comme décrit plus haut (OEPP, 1998).

### 3.2 Détection dans des végétaux asymptomatiques

La détection de *X. citri* sous-esp. *citri* dans des végétaux asymptomatiques peut être réalisée par les moyens suivants: isolement et enrichissement sur des milieux semi-sélectifs (voir ci-après), techniques sérologiques (IMF (section 3.1.3)) et analyses moléculaires (section 3.1.4).

Pour isoler *X. citri* sous-esp. *citri* sur des milieux semi-sélectifs à partir de végétaux asymptomatiques, il faut laver les échantillons de feuilles ou de fruits dans une solution tampon peptonée, concentrer le surnageant et l'étaler sur le milieu de culture (Verdier *et al.*, 2008). Un échantillon consiste en dix feuilles ou en un fruit.

Les échantillons sont secoués pendant 20 minutes à température ambiante dans 50 ml de solution tampon peptonée (NaCl, 8,5 g; peptone, 1 g; Tween 20, 250 µl; eau distillée, 1 litre; pH 7,2). Pour les échantillons en vrac, on peut utiliser 100 feuilles dans 200 ml de solution tampon peptonée. Chaque fruit est secoué pendant 20 minutes à température ambiante dans un sac stérile contenant 50 ml de solution tampon peptonée.

La suspension est ensuite centrifugée à 6 000 g pendant 20 minutes. Le surnageant est décanté et le culot est remis en suspension dans 20 ml de solution saline à 0,85 pour cent. Des parties aliquotes (100 µl) de dilutions à 1:100 et 1:1000 de chaque suspension sont déposées en stries, à raison de trois répétitions, sur du milieu de culture semi-sélectif XOS (sucrose, 20 g; peptone, 2 g; glutamate monosodique, 5 g; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0,3 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g; EDTA-Fe, 1 mg; cycloheximide, 100 mg; céphalexine, 20 mg; kasugamycine, 20 mg; violet de méthyle 2B, 0,3 mg; Bacto Agar, 17 g; eau distillée, 1 litre; pH 7,6) (Monier, 1992). Après incubation à 28 °C pendant 5 à 6 jours, la croissance ainsi que le type et la morphologie des colonies sont évalués (section 3.1.2).

## 4. Identification

L'identification des colonies présumées de *X. citri* sous-esp. *citri* devrait être validée au moyen de plusieurs techniques car d'autres espèces de *Xanthomonas*, notamment *X. fuscans* sous-esp. *gracifolia* et *X. alfalfae* sous-esp. *citrumelonis*, peuvent être isolées à partir d'agrumes. Les techniques autres que l'observation des caractéristiques morphologiques sur milieu nutritif sont les suivantes: analyse sérologique, analyse moléculaire, tests biologiques sur disques de feuille ou sur feuilles détachées et analyse de la pathogénicité.

Les exigences minimales à satisfaire pour valider l'identification d'une culture pure sont l'obtention d'un résultat positif par chacune des trois techniques ci-après: 1) PCR réalisée avec deux séries d'amorces (section 4.1); 2) technique sérologique (IMF, analyse par dosage immunoenzymatique utilisant deux antisérums spécifiques (sandwich à deux antisérums) (DAS-ELISA) ou dosage ELISA indirect, sections 4.2, 4.2.1 et 4.2.2) réalisée avec des anticorps monoclonaux spécifiques; et 3) analyse de la pathogénicité par inoculation d'agrumes hôtes afin de satisfaire aux exigences des postulats de Koch (sections 4.3 et 3.1.6). Des analyses complémentaires (sections 4.4 et 4.5) peuvent être effectuées pour affiner la caractérisation de la souche présente. Des témoins positifs et négatifs doivent être inclus dans toutes les analyses. Les techniques recommandées sont décrites dans les sections ci-après.

Les collections suivantes, notamment, peuvent fournir des souches de référence de *X. citri* sous-esp. *citri* (les isolats de *X. citri* sous-esp. *citri* qu'il est recommandé d'employer en tant que témoins positifs sont précisés):

- NCPPB 3234, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Central Science Laboratory, York, Royaume-Uni
- CFPB 2911, Collection française de bactéries phytopathogènes, Station de phytobactériologie de l'INRA, Angers, France (il s'agit d'une souche A\* de *X. citri* sous-esp. *citri*)
- ICMP 24, International Collection of Microorganisms from Plants, Landcare Research (Manaaki Whenua) New Zealand Ltd, Auckland, Nouvelle-Zélande
- ATTC 49118, American Type Culture Collection, Manassas, VA, États-Unis
- IBSBF 1594, Biological Institute Culture Collection of Phytopathogenic Bacteria, Centro Experimental Central do Instituto Biológico - Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Campinas, Brésil.

Seule une obtention directe auprès de collections de cultures permet de garantir l'authenticité des souches.

#### 4.1 Méthodes PCR

Outre l'application du protocole PCR tel qu'il est décrit à la section 3.1.4.3, il est recommandé de confirmer l'identification des cultures pures des souches de référence. Cette vérification est respectée en employant deux séries d'amorces différentes. La première série pourrait être constituée par les amorces *J-ptH1/J-ptH2* ou *J-RXg/J-RXc2* (Cubero et Graham, 2002) et l'autre par les amorces Xac01/Xac02 (Coletto-Filho *et al.*, 2005) ou XACF/XACR (Park *et al.*, 2006) (niveau 1). En effet, il a été observé que la plupart des couples d'amorces ayant été l'objet de publications n'étaient pas spécifiques (Delcourt *et al.*, 2013). On peut confirmer un peu plus l'identification en séquençant les amplicons obtenus par PCR et en comparant leurs séquences à celles de souches de *X. citri* sous-esp. *citri* déposées dans la banque de données GenBank du National Center for Biotechnology Information (NCBI).

**Le protocole PCR de Cubero et Graham (2002)** a abouti à la mise au point des amorces PCR pour les régions spécifiques à *X. citri* sous-esp. *citri* de l'espaceur transcrit interne (ITS) des ADNr 16S et 23S. La variation dans les séquences ITS a permis de concevoir des amorces spécifiques à *X. citri* sous-esp. *citri*, qui détectent aussi les souches atypiques A\* et A<sup>w</sup> (Cubero et Graham, 2002). Les amorces sont les suivantes:

*J-RXg*: 5'-GCGTCTAAGGCTTAGACATG-3'

*J-RXc2*: 5'-AAGTTCGTCGGAGCTATC-3'.

La PCR est réalisée sur des volumes de mélange réactionnel de 25 µl contenant tampon Taq du 1×, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,04 µM d'amorce *J-RXg*, 0,04 µM d'amorce *J-RXc2*, 0,2 mM de chaque de dNTP et de Taq ADN polymérase 1 U. Les paramètres d'amplification PCR sont les mêmes que ceux qui sont utilisés avec les amorces *pthA* et sont décrits à la section 3.1.4.3.

**Le protocole PCR de Coletta-Fiho *et al.* (2006)** a abouti à la mise au point des amorces liées au groupe de gènes *rpf*. Les amorces sont les suivantes:

Xac01: 5'-CGCCATCCCCACCACCACGAC-3'

Xac02: 5'-AACCGCTCAATGCCATCCACTTCA-3'.

La PCR est réalisée sur des volumes de mélange réactionnel de 25 µl contenant tampon Taq du 1×, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,36 µM de chacune des amorces, 0,25 mM de chaque de dNTP et de Taq ADN polymérase 1 U. Les paramètres d'amplification PCR sont une phase initiale de dénaturation à 94 °C pendant 3 minutes, suivie de 36 cycles à 94 °C pendant 45 secondes, 60 °C pendant 45 secondes et 72 °C pendant 45 secondes, et une phase finale d'élongation à 72 °C pendant 5 minutes. La taille de l'amplicon est de 582 pb.

Le protocole PCR de Park *et al.* (2006) a abouti à la mise au point des amorces liées aux séquences du gène *hrpW*. Les amorces sont les suivantes:

XACF: 5'- CGTCGCAATACGATTGGAAC-3'

XACR: 5'- CGGAGGCATTGTCTGAAGGAA-3'.

La PCR est réalisée sur des volumes de mélange réactionnel de 25 µl contenant tampon Taq du 1×, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,10 µM de chacune des amorces, 0,25 mM de chaque de dNTP, de gélatine à 0,01% et de Taq ADN polymérase 2 U. Les paramètres d'amplification PCR sont une phase initiale de dénaturation à 94 °C pendant 5 minutes, suivie de 30 cycles à 94 °C pendant 15 secondes, 60 °C pendant 30 secondes et 72 °C pendant 30 secondes et une phase finale d'élongation à 72 °C pendant 7 minutes. La taille de l'amplicon est de 561 pb.

**Tableau 1.** Tableau récapitulatif des méthodes PCR décrites dans le présent protocole de diagnostic.

Les données relatives à la spécificité sont tirées de Delcourt *et al.* (2013). \* La colonne « Détection non spécifique » indique le pourcentage de xanthomonadaceae pathogènes et de saprophytes qui ont donné des résultats positifs. \*\* N'a pas donné de résultat positif avec des souches de saprophytes.

Couple d'amorces	Référence	Taille de l'amplicon (pb)	Détection de la souche de <i>X. citri</i> sous-esp. <i>citri</i>	Détection non spécifique (%)*	Limite de détection sur du matériel végétal
2/3	Hartung <i>et al.</i> (1993)	224	Ne détecte pas la souche A <sup>w</sup> ni les autres souches A	17	10 <sup>2</sup> ufc/ml
<i>J-pth1/J-pth2</i>	Cubero et Graham (2002)	198	Toutes les souches	51	10 <sup>4</sup> ufc/ml
<i>J-Rxg/J-Rxc2</i>	Cubero et Graham (2002)	170	Toutes les souches	30	10 <sup>4</sup> ufc/ml
<i>Xac01/Xac02</i>	Coletto-Filho <i>et al.</i> (2005)	582	Toutes les souches	16	10 <sup>4</sup> ufc/ml
XACF/XACR	Park <i>et al.</i> (2006)	561	Toutes les souches	6**	Aucune information donnée

## 4.2 Détection sérologique

Outre l'application du protocole DMF qui est décrit à la section 3.1.3, il est recommandé d'employer différents anticorps pour identifier les cultures pures. Les tests DAS-ELISA ou ELISA indirect peuvent ainsi constituer une alternative pour l'identification de cultures pures par analyse sérologique.

### 4.2.1 DAS-ELISA

Pour le dosage DAS-ELISA, les plaques de microtitrage sont revêtues (100 µl/puits) de tampon carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,59 g; NaHCO<sub>3</sub>, 2,93 g; NaN<sub>3</sub>, 0,2 g; eau distillée, 1 litre; pH 9,6) contenant des immunoglobulines (IgG) anti-*X. citri* sous-esp. *citri* diluées comme il convient, et sont mises à incuber pendant une nuit à 4 °C. Après avoir lavé les plaques trois fois avec du PBS-Tween (NaCl, 8 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 2,9 g; KCl, 0,2 g; NaN<sub>3</sub>, 0,2 g; Tween 20, 0,25 ml; eau distillée, 1 litre; pH 7,4), on ajoute (200 µl/puits) l'échantillon de l'analyse, le témoin négatif (matériel végétal sain) ou le témoin positif (souche de référence de *X. citri* sous-esp. *citri*). Les plaques sont mises à incuber pendant 2 heures à 37 °C. Après lavage, on ajoute (200 µl/puits) du PBS-Tween contenant à la dilution qui convient des IgG anti-*X. citri* sous-esp. *citri* conjuguées à de la phosphatase alcaline et on met les plaques à incuber pendant 2 heures à 37 °C. Après lavage, on ajoute (200 µl/puits) du tampon de substrat contenant du p-nitrophényl phosphate (1 mg/ml) et on met les plaques à incuber pendant 30 à 60 minutes à température ambiante. L'absorbance est mesurée au moyen d'un spectrophotomètre équipé d'un filtre 405 nm. Le critère qui détermine la positivité d'un échantillon est une densité optique (DO) égale à deux fois la valeur de la densité optique du matériel végétal sain témoin. La limite de détection du test DAS-ELISA va de 10<sup>4</sup> à 10<sup>5</sup> ufc/ml (Civerolo et Fan, 1982). Cette méthode n'est pas recommandée pour la détection directe dans du tissu végétal.

Il existe des anticorps monoclonaux pour tests ELISA, mais il est conseillé de les employer exclusivement pour l'identification de cultures pures compte tenu de leur faible sensibilité s'agissant de l'identification dans du tissu végétal. Des kits de détection par ELISA de *X. citri* sous-esp. *citri* sont en vente (par exemple, Agdia, Inc.). En ce qui concerne les données relatives à la spécificité, il faut se référer aux informations techniques fournies par le fabricant. Des réactions croisées de certains anticorps monoclonaux avec *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. campestris* pv. *zinnea*, *X. alfalfae* sous-esp. *citrumelonis* et *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* ont été signalées; cependant, il est peu probable que ces pathovars soient présents sur des agrumes.

#### 4.2.2 ELISA indirect

On peut utiliser le test ELISA indirect avec anticorps monoclonaux décrit par Alvarez *et al.* (1991) pour l'identification de cultures. Des kits ELISA contenant tous les éléments nécessaires à l'identification de *X. citri* sous-esp. *citri* sont en vente (par exemple, Agdia, Inc.). En théorie, toutes les souches de *X. citri* sous-esp. *citri* peuvent être identifiées, mais il a été signalé que certaines souches à phénotype distinct qui ont été isolées en Asie du Sud-Ouest ne réagissaient pas avec les anticorps monoclonaux disponibles (Vernière *et al.*, 1998).

Des suspensions de culture pure sont centrifugées à 10 000 g environ pendant 10 minutes et le surnageant est éliminé. On ajoute 1 ml de PBS 1× et on remet les cellules en suspension au moyen d'un vortex. L'opération est répétée deux fois de plus. Après le troisième lavage on remet les cellules en suspension dans du tampon de revêtement. La concentration bactérienne est ajustée par spectrophotométrie à  $DO_{600} = 0,01$  (approximativement  $2,5 \times 10^8$  ufc/ml). Des parties aliquotées des échantillons sont transférées sur des plaques de microtirage (deux puits par échantillon, 100 µl/puits). Un témoin positif (culture ou échantillon de référence fourni par le fabricant) et un tampon témoin négatif contenant une autre bactérie devraient être inclus. Les plaques sont mises à incuber pendant une nuit à 37 °C jusqu'à séchage complet. On ajoute (200 µl/puits) une solution de blocage (solution de PBS et de lait écrémé en poudre à 5 pour cent). Les plaques sont incubées pendant 30 minutes à température ambiante puis lavées deux fois avec du PBS-Tween 1×. On ajoute (100 µl/puits) une solution de PBS-Tween et de lait en poudre à 2,5 pour cent contenant l'anticorps primaire à la dilution qui convient. Les plaques sont incubées pendant une heure à la température ambiante puis lavées cinq fois avec du PBS-Tween 1×. On ajoute (100 µl/puits) une solution de PBS-Tween et de lait en poudre à 2,5 pour cent contenant l'enzyme conjuguée à la dilution qui convient. Les plaques sont incubées pendant 1 heure à la température ambiante puis lavées cinq fois avec du PBS-Tween 1×. On ajoute (à raison de 100 µl/puits) une solution de substrat fraîchement préparée contenant 1 mg/ml de p-nitrophényl phosphate dans un tampon diéthanolamine (pH 9,8). Les plaques sont incubées pendant 30 à 60 minutes à température ambiante. La densité optique est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre équipé d'un filtre 405 nm. Les échantillons positifs sont déterminés de la même façon que dans le test DAS-ELISA.

#### 4.3 Analyse de la pathogénicité

Pour une confirmation du diagnostic, *X. citri* sous-esp. *citri* devrait être identifié par sa pathogénicité sur un groupe d'hôtes indicateurs tels que *C. paradisi* var. Duncan (pomelo), *Citrus sinensis* (orange douce) ou *C. aurantiifolia* (limettier mexicain).

Des tests sur des feuilles, consistant à pratiquer une infiltration avec une seringue munie ou non d'aiguille sur des cultivars sensibles d'agrumes hôtes, permettent de démontrer la pathogénicité des colonies bactériennes. Les feuilles immatures, au moins développées à hauteur de 50 à 70 pour cent voire entièrement développées, sont préférées en raison de leur forte sensibilité. Des lésions se forment de 7 à 14 jours après l'inoculation des feuilles intactes ou des feuilles détachées (Francis *et al.*, 2010; Koizumi, 1971), qui ont été mises à incuber à 25 °C dans des conditions de forte humidité. Avec ces tests, la réaction éruptive de *X. citri* sous-esp. *citri*, semblable à la formation d'un cal, peut facilement être observée. Des bactéries cultivées dans un milieu liquide ou bien des colonies provenant d'une plaque de gélose fraîchement ensemencée en stries sont remises en suspension dans de l'eau distillée stérile, puis la concentration est ajustée à  $10^6$ – $10^8$  ufc/ml pour inoculation dans des hôtes. Un témoin

positif et un témoin négatif devraient toujours être inclus. Les plants inoculés avec la souche témoin positive devraient être tenus à l'écart des plants de l'analyse.

#### 4.4 Description et caractéristiques biochimiques

*X. citri* sous-esp. *citri* est une bactérie à Gram négatif, droite, en forme de bâtonnet, qui mesure  $1,5-2,0 \times 0,5-0,75 \mu\text{m}$ . Elle est mobile grâce à un flagelle polaire unique. Un grand nombre de ses propriétés physiologiques et biochimiques sont communes aux autres membres du genre *Xanthomonas*. Elle est chimoorganotrophe, aérobie stricte et dotée d'un métabolisme oxydatif du glucose. Le pigment jaune est la xanthomonadine. Certaines des caractéristiques biochimiques qui permettent d'identifier *X. citri* sous-esp. *citri* sont présentées dans le tableau 2.

**Tableau 2.** Principales caractéristiques biochimiques de *Xanthomonas citri* sous-esp. *citri*

Test	Résultat
Catalase	+
Oxydase	– ou faible
Réduction des nitrates	–
Hydrolyse:	
de l'amidon	+
de la caséine	+
du Tween 80	+
de l'esculine	+
Liquéfaction de la gélatine	+
Liquéfaction du gel de pectate	+
Utilisation de l'asparagine	
La croissance demande:	
de la méthionine	+
de la cystéine	+
du chlorure de triphényl tétrazolium (TTC) à 0,2% (poids/volume)	–

#### 4.5 Identification moléculaire

Les caractéristiques des xanthomonades qui s'attaquent aux agrumes, notamment *X. citri* sous-esp. *citri* et le genre *Xanthomonas* dans son ensemble, ont été déterminées à l'échelle moléculaire aux fins de la mise au point de méthodes de reclassification et d'identification à la fois rapides et exactes. Les procédures suivantes sont utilisées: hybridation de l'ADN (Vauterin *et al.*, 1995), prise d'empreinte génétique (Ruturaj *et al.*, 1987; Lazo *et al.*, 1987), analyse de séquence multilocus (Young *et al.*, 2008) et amplification de séquences répétitives (rep-PCR) (Cubero et Graham, 2002, 2004).

##### 4.5.1 Analyse de séquence multilocus

La technique de l'analyse de séquence multilocus (Multilocus sequence analysis - MLSA) a été utilisée pour procéder à l'identification spécifique de *X. citri* sous-esp. *citri*. (Almeida *et al.*, 2010; Bui Thi Ngoc *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2008). Des gènes domestiques sont amplifiés avec les amorces et les paramètres d'amplification PCR décrits par Almeida *et al.* (2010), Bui Thi Ngoc *et al.* (2010) et Young *et al.*, (2008). La MLSA consiste à séquencer plusieurs loci (en général quatre à huit gènes domestiques) et à comparer ces séquences aux séquences de référence des espèces de *Xanthomonas* déposées dans des bases de données de nucléotides; par exemple, la Plant Associated Microbes Database (PAMDB) (<http://genome.ppws.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.pl>) (Almeida *et al.*, 2010) et la MLVAbank pour le génotypage de microbes ([https://bioinfo-prod.mpl.ird.fr/MLVA\\_bank/Genotyping/](https://bioinfo-prod.mpl.ird.fr/MLVA_bank/Genotyping/)).

#### 4.5.2 Prise d'empreinte génétique par rep-PCR

On peut effectuer une prise d'empreinte génétique au moyen d'une rep-PCR réalisée avec des amorces développées à partir d'éléments REP (répétitifs extragéniques palindromiques) – séquences ERIC (consensus entérobactériennes intergéniques répétitives) et élément BOX (Louws *et al.*, 1994) – pour procéder à l'identification et à la caractérisation des souches, en utilisant des paramètres PCR spécifiques (Cubero et Graham, 2002).

L'ADN peut être extrait de suspensions bactériennes (absorbance à 600 nm: de 0,2 à 0,5) en une seule étape avec du phénol-chloroforme-alcool isoamylique, être précipité dans de l'éthanol et être remis en suspension dans de l'eau ultrapure. L'ADN est conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation. On peut aussi appliquer le protocole d'extraction d'ADN décrit à la section 3.1.4.2.

La BOX PCR est réalisée sur des volumes de mélange réactionnel de 25  $\mu\text{l}$  contenant du tampon Taq 1 $\times$ , 6 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 2,4  $\mu\text{M}$  d'amorce BOX1R (5'-CTACG-GCAAGGCGAG-GCTGC-3') (Louws *et al.*, 1994), 0,2 mM de chaque de dNTP, et de Taq ADN polymérase 2 U et 5  $\mu\text{l}$  d'ADN extrait de souches de xanthomonadaceae. Les paramètres de la réaction sont une phase initiale à  $94^{\circ}\text{C}$  pendant 5 minutes, suivie de 40 cycles à  $94^{\circ}\text{C}$  pendant 30 secondes,  $48^{\circ}\text{C}$  pendant 30 secondes et  $72^{\circ}\text{C}$  pendant 1 minute, et une phase finale à  $72^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes. Les produits de la PCR sont analysés sur des gels d'agarose à 3 pour cent dans du tampon Tris-acétate-EDTA 1 $\times$  (TAE) (40 mmol/litre de Tris-acétate; 1 mmol/litre d'EDTA; pH 8,0), séparés par électrophorèse pendant 2 h à 110 Volts et colorés avec du bromure d'éthidium.

L'ERIC PCR est réalisée sur des volumes de mélange réactionnel de 25  $\mu\text{l}$  contenant du tampon Taq 1 $\times$ , 3 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1,2  $\mu\text{M}$  d'amorce ERIC1R (5'-ATGTA-TCCT-GGGGATTCAC-3') et d'amorce ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACT-GC-CTGAC-3') (Louws *et al.*, 1994), 0,2 mM de chaque de dNTP et de Taq DNA polymerase 2 U et 5  $\mu\text{l}$  d'ADN extrait de souches de xanthomonadaceae. Les paramètres de la réaction sont les mêmes que ceux de la BOX PCR. La visualisation des produits de la PCR est réalisée de la même façon que pour la BOX PCR.

On peut comparer et analyser les empreintes génétiques (profils de bandes) à l'œil nu pour déterminer les similitudes, mais on peut aussi transformer les bandes en pics pour comparer les souches au moyen d'un logiciel informatique tel que BioNumerics (Applied Maths). L'identification devrait reposer sur l'analogie avec les profils de souches connus (de référence) (section 4).

Les dispositifs de détection et d'identification de *Xanthomonas citri* sous-esp. *citri* sur du matériel végétal symptomatique et sur du matériel végétal asymptomatique sont présentés dans les figures 5 et 6, respectivement.

#### 5. Données à conserver

Les données et les éléments à enregistrer et à conserver sont énumérés à la section 2.5 de la NIMP 27 (*Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés*).

Lorsque les résultats du diagnostic peuvent concerner d'autres parties contractantes, il est recommandé de conserver une ou plusieurs culture(s) de l'organisme nuisible, des spécimens conservés/montés ou du matériel d'analyse (par exemple, photographies de gels, résultats imprimés de plaques ELISA, amplicons PCR) de l'échantillon original (avec étiquetage pour assurer la traçabilité), pendant au moins un an, en particulier en cas de non-conformité (NIMP 13 (*Directives pour la notification de non-conformité et d'action d'urgence*)) et lorsque des organismes nuisibles sont trouvés pour la première fois dans un pays ou dans une zone.

#### 6. Points de contact pour tout complément d'information

General Direction of Agricultural Services, Biological Laboratories Department, Av. Millán 4703, CP 12900, Montevideo, Uruguay (Enrique F. Verdier; courriel: [emvermar@adinet.com.uy](mailto:emvermar@adinet.com.uy); tél.: +59823043992).

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 4.5, 46113 Moncada (Valencia), Espagne (María M. López; courriel: [mlopez@ivia.es](mailto:mlopez@ivia.es); tél.: +34 963424000; télécopie: +34 963424001).

Instituto Nacional de Investigación Agraria y Tecnología Alimentaria, INIA, Ctra de La Coruña km 6, Madrid, Espagne (Jaime Cubero; courriel: [cubero@inia.es](mailto:cubero@inia.es); tél.: +34 913473900; télécopie: +34 913572293).

Une demande de révision d'un protocole de diagnostic peut être présentée par les organisations nationales de la protection des végétaux (ONPV), les organisations régionales de la protection des végétaux (ORPV) ou les organes subsidiaires de la Commission des mesures phytosanitaires (CPM) au Secrétariat de la CIPV ([ippc@fao.org](mailto:ippc@fao.org)), qui la communique au Groupe technique sur les protocoles de diagnostic (TPDP).

## 7. Remerciements

La première version du présent protocole a été rédigée par M. E.F. Verdugo (General Direction of Agricultural Services, Biological Laboratories Department, Uruguay (voir les coordonnées à la section 6), et a été révisée par Mme R. Lanfranchi, Plant Pests and Disease Laboratory, National Service of Agrifood Health and Quality, SENASA, Av. Ing. Huergo 1001, CP 1100, Buenos Aires, Argentine (Rita Lanfranchi; courriel: [ritalanfranchi@hotmail.com](mailto:ritalanfranchi@hotmail.com); tél.: +5411 43621177 int. 118); M. Ed Civerolo, USDA, États-Unis (courriel: [emciv@comcast.net](mailto:emciv@comcast.net)) et Mme M.M. López - IVIA, Espagne (voir les coordonnées à la section 6). De plus, J. Cubero, INIA, Espagne (voir les coordonnées à la section 6) a participé activement à l'élaboration du présent protocole.

## 8. Références

- Almeida, N.F., Yan, S., Cai, R., Clarke, C.H., Morris, G.J., Schaad, N.W., Schuenzel, E.L., Lacy, G.H., Sun, X., Jones, J.B., Castillo, J.A., Bull, C.T., Leman, S., Guttman, D.S., Setubal, J.C. & Vinatzer, B. A. 2010. PAMoB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology*, 100(3): 208–215.
- Álvarez, A.M., Benedict, A.A., Mizumoto, S., Bernard, L.W. & Civerolo, E.L. 1991. Analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and *X.c.* pv. *citrumelo* with monoclonal antibodies. *Phytopathology*, 81: 857–865.
- Bui Thi Ngoc, L., Verrière, C., Jouen, E., Ah-You, N., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., Gagnevin, L. & Pruvost, O. 2010. Amplified fragment length polymorphism and multilocus sequence analysis-based genotypic relatedness among pathogenic variants of *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas campestris* pv. *bilvae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(5): 515–525.
- Bull, C.T., De Boer, S.H., Denny, T.P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Saddler, G.S., Stettin, M., Schaad, D.E. & Takikawa, Y. 2010. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980–2007. *Journal of Plant Pathology*, 92(3): 551–592.
- CABI. 2006. *Crop protection compendium*. Wallingford, UK, CABI.
- Civerolo, E.L. & Fan, F. 1982. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* detection and identification by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Disease*, 66: 231–236.
- Coletta-Filho, H.D., Takita, M.A., Souza, A.A., Neto, J.R., Destefano, S.A.L., Hartung, J.S. & Machado, M.A. 2006. Primers based on the rpf gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. *Journal of Applied Microbiology*, 100(2): 279–285.
- Cubero, J. & Graham, J.H. 2002. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1257–1264.

- Cubero, J. & Graham, J.H.** 2004. The leucine-responsive regulatory protein (lrp) gene for characterization of the relationship among *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 429–437.
- Cubero, J. & Graham, J.H.** 2005. Quantitative real time polymerase chain reaction for bacterial enumeration and allelic discrimination to differentiate *Xanthomonas* strains on citrus. *Phytopathology*, 95: 1333–1340.
- Cubero, J., Graham, J.H. & Gottwald, T.R.** 2001. Quantitative PCR method for diagnosis of citrus bacterial canker. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2849–2852.
- Delcourt, S., Vernière, C., Boyer, C., Pruvost, O., Hostachy, B. & Robène-Soustrade, I.** 2013. Revisiting the specificity of PCR primers for diagnostics of *Xanthomonas citri* pv. *citri* by experimental and in silico analyses. *Plant Disease*, 97(3): 373–378.
- Dye, D.W.** 1978. Genus IX. *Xanthomonas* Dowson 1939. In: Young, J. M., Dye, D. W., Bradbury, J. F., Panagopoulos, C. G., & Robbs, C. F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 21(1): 157–177.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization).** 1997. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Data Sheets on Quarantine Pests. EPPO A1 list No. 1. Paris, EPPO.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization).** 1998. *Phytosanitary procedure Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Inspection, test and survey methods* EPPO Standard PM 3/27(1). Paris, EPPO.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization).** 2000. PQR database (version 4.5). Paris, EPPO.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization).** 2009. *Indirect immunofluorescence test for plant pathogenic bacteria*. EPPO Standard PM 7/97(1). Paris, EPPO.
- Escalon, A., Javegny, S., Vernière, C., Jöbel, L.D., Vriel, K., Poussier, S., Hajri, A., Boureau, T., Pruvost, O., Arlat, M. & Cagnon, L.** 2013. Variations in type III effector repertoires, pathological phenotypes and host range of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes. *Molecular Plant Pathology*, 14(5): 483–496.
- Francis, M.I., Pena, A. & Graham, J.H.** 2010. Detached leaf inoculation of germplasm for rapid screening of resistance to citrus canker and citrus bacterial spot. *European Journal of Plant Pathology*, 127(4): 571–578.
- Gabriel, D.W., Kinsley, M.T., Hunter, J.E. & Gottwald, T.** 1989. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hassey) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(1): 14–22.
- Golmohammadi, M., Cubero, J., Peñalver, J., Quesada, J.M., López, M.M. & Llop P.** 2007. Diagnosis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causal agent of citrus canker in commercial fruits by isolation and PCR based methods. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6): 2309–2315.
- Goto, M.** 1992. Citrus canker. In J. Kumer, H.S. Chaube, U.S. Singh and A.N. Mukhopadhyay, eds. *Plant diseases of international importance*, Vol. III, *Diseases of fruit crops*, pp. 170–208. Upper Saddle River, NJ, Prentice Hall.
- Graham, J., Gottwald, T.R., Civerolo, E.L. & McGuire, R.G.** 1989. Population dynamics and survival of *Xanthomonas campestris* in soil in citrus nurseries in Maryland and Argentina. *Plant Disease*, 43(5): 423–427.
- Hall, D.G., Gottwald, T.R. & Bock, C.H.** 2010. Exacerbation of citrus canker by citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* in Florida. *Florida Entomologist*, 93(4): 558–566.
- Hartung, J.S. & Civerolo, E.L.** 1987. Genomic fingerprinting of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains from Asia, South America and Florida. *Phytopathology*, 77: 282–285.

- Hartung, J.S., Daniel, J.F., Pruvost, O.P. & Civerolo, E.L.** 1993. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4): 1143–1148.
- Hasse, CH.** 1915. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. A preliminary report. *Journal of Agricultural Research* 4, 97-100.
- ISPM 13.** 2001. Guidelines for the notification of non-compliance and emergency action. Rome, IPPC, FAO.
- ISPM 27.** 2006. Diagnostic protocols for regulated pests. Rome, IPPC, FAO.
- Koizumi, M.** 1971. A quantitative determination method for *Xanthomonas citri* by inoculation into detached citrus leaves. *Bulletin of the Horticultural Research Station (Japan), Series B*, 11: 167–182.
- Lazo, G.R., Roffey, R. & Gabriel, D.W.** 1987. Pathovars of *Xanthomonas campestris* are distinguishable by restriction fragment-length polymorphism. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37: 214–221.
- Llop, P., Caruso, P., Cubero, J., Morente, C. & López, M.M.** 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiology Methods*, 37: 23–31.
- Louws, F.J., Fulbright, D.W., Taylor Stephens, C. & Brujin, F.J.** 1991. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2286–2295.
- Mafra, V., Kubo, K.S., Alves-Ferreira, M., Ribeiro-Alves, M., Stuart, R.M., Boava, L.P., Rodrigues, C.M. & Machado, M.** 2012. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *PloS One*, 7(2), e31263.
- Mavrodieva, V., Levy, L. & Gabriel, D.W.** 2004. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. *Phytopathology*, 94: 61–68.
- Monier, L.** 1992. *Contribution à la mise au point d'un milieu de culture semi-sélectif pour la détection de Xanthomonas campestris pv. citri, agent du chancre bactérien des agrumes.* Angers, France, Ecole Nationale d'ingénieurs des Travaux de l'Horticulture et du Paysage d'Angers, Institut de Recherches sur les Fruits et Agrumes (IRFA). 62 pp [in French].
- Namekata, T. de Oliveira, AR.** Comparative serological studies between *Xanthomonas citri* and a bacterium causing canker of Mexican lime. In Proceedings of International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Wageningen, The Netherlands, 1972, pp.151-152
- Park, D., Hyun, S.-Y., Kim, J., Kang, H., Hahn, J. & Go, S.** 2006. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by PCR using pathovar specific primers based on *hrpA* gene sequences. *Microbiological Research*, 161(2): 145–149.
- Pruvost, O., Roumagnac, P., Gaube, C., Chiroleu, F. & Gagnevin, L.** 2005. New media for the semiselective isolation and enumeration of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, the causal agent of mango bacterial black spot. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4): 803–815.
- Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G.H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E., Stromberg, V.K. & Vidaver, A.K.** 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel *et al.*, 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel *et al.*, 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. rev.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker *et al.*, 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var.

- fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 494–518.
- Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G.H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E., Stromberg, V.K. & Vidaver, A.K.** 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 690–695.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K. & Vidaver, A. K.** (2007). *Xanthomonas alfalfae* sp. nov., *Xanthomonas citri* sp. nov. and *Xanthomonas fuscans* sp. nov. In List of New Names and New Combinations Previously Effectively, but not Validly, Published, Validation List no. 115. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 893–897.
- Sun, X., Stall, R.E., Jones, J.B., Cubero, J., Gottwald, T.R., Graham, J.H., Dixon, W.D., Schubert, T.S., Chaloux, P.H., Stromberg, V.K., Lacy, G.H. & Sutton, T.D.** 2004. Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from key/Mexican lime and alemow in South Florida. *Plant Disease*, 88(11): 1179–1188.
- Taylor, R.K., Tyson, J.L., Fullerton, R.A. & Hale, C.N.** 2002. Molecular detection of exotic phytopathogenic bacteria: A case study involving canker-like symptoms on citrus, New Zealand. *Plant Protection*, 55: 53–57.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. & Swings, J.** 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 473–489.
- Verdier, E., Zefferino, E. & Méndez, S.** 2008. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* on the surface of citrus fruit after postharvest treatment. *Fitopatologia*, 43: 24–31.
- Vernière, C., Hartung, J.S., Pruvost, O.P., Civerolo, F.L., Álvarez, A.M., Maestri, P. & Luisetti, J.** 1998. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 477–487.
- Weisberg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, J.A. & Lane, D.J.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 133: 697–703.
- Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N., Brennan, N., & Stead, D.E.** 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7): 2853–2858.
- Young, J.M., Park, D., Shearman, S.L. & Fargier, E.** 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(5): 366–377.

## 9. Figures



**Figure 1.** Symptômes caractéristiques du chancre bactérien des agrumes sur des feuilles, des rameaux et un fruit de pomelo (*Citrus paradisi*).



**Figure 2.** Symptômes du chancre bactérien des agrumes sur un rameau: lésions récentes sur pomelo (*Citrus paradisi*).



**Figure 3.** Symptômes du chancre bactérien des agrumes sur des fruits: orange douce (*Citrus sinensis*) (à gauche) et pomelo (*Citrus paradisi*) (au centre et à droite).



**Figure 4.** Symptômes du chancre bactérien des agrumes sur des feuilles de citronnier (*Citrus limon*), exacerbés par des blessures dues à la mineuse des agrumes.

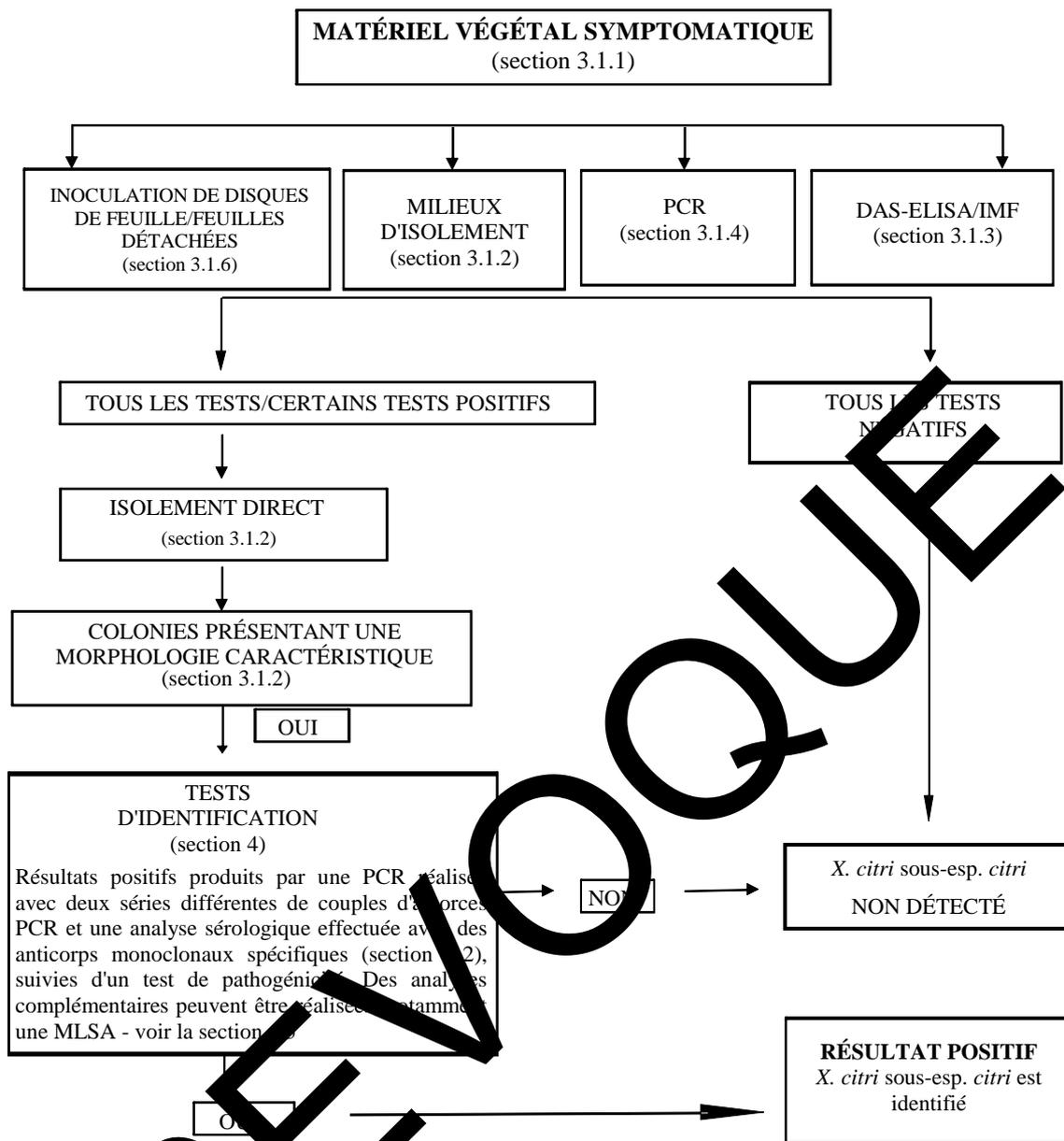


Figure 5. Dispositif de détection et d'identification de *Xanthomonas citri* sous-esp. *citri* sur du matériel végétal symptomatique.

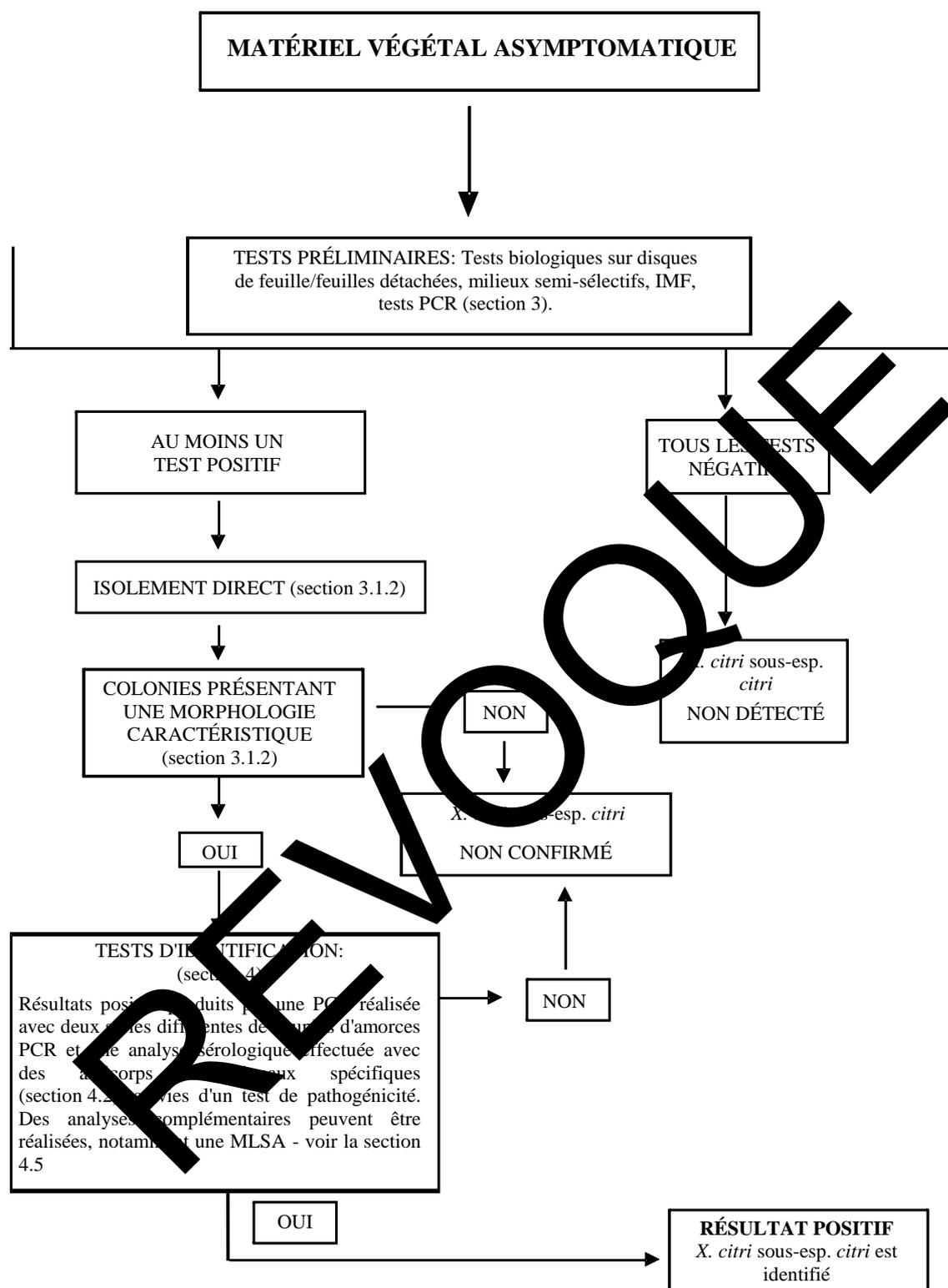


Figure 6. Dispositif de détection et d'identification de *Xanthomonas citri* sous-esp. *citri* sur du matériel végétal asymptotique.

### Étapes de la publication

*Ce récapitulatif ne fait pas officiellement partie de la norme.*

Les étapes de la publication sont spécifiques à la version française. Pour la totalité des étapes de la publication, se référer à la version anglaise de la norme.

2004-11 Le CN ajoute le sujet *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (2004-011) au programme de travail

La CMP-1 (2006) ajoute le sujet *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (2004-011) sous le thème bactéries (2006-005)

2012-11 Le TPDP révisé le projet de protocole

2013-04 Le CN approuve le projet par décision électronique en vue de sa présentation aux membres pour consultation (2013\_eSC\_May\_12)

2013-07 Consultation des membres

2014-02 Le TPDP révisé le projet et le présente au CN pour approbation en vue de l'adoption (2014\_eTPDP\_Feb\_02)

2014-04 Projet présenté au CN pour approbation par décision électronique en vue de l'adoption (2014\_eSC\_May\_16)

2014-06 Le CN approuve le projet par décision électronique en vue de sa transmission pour la période de notification de 45 jours (2014\_eSC\_Nov\_03)

2014-07 Le CN adopte le protocole de diagnostic au nom de la CMP (aucune objection formelle reçue)

2014-10 Le Secrétariat rectifie de petites erreurs rédactionnelles

2014-11 Le Secrétariat rectifie de petites erreurs rédactionnelles

**NIMP 27. Annexe 6** *Xanthomonas citri* sous-esp. *citri* (2014). Rome, CIPV, FAO.

2015-08 Le Secrétariat révisé le format de cette Annexe conformément à la procédure validée par la CMP-10 (2015) de révocation des anciennes normes

Dernière mise à jour des étapes de la publication: 2015-12