



UN TEST POUR LA DÉTECTION DE LA RÉSISTANCE DE *ERWINIA AMYLOVORA* À LA STREPTOMYCINE

Lise Vézina, technicienne de laboratoire

Michel Lacroix, agronome-phytopathologue

Direction de l'innovation scientifique et technologique

La bactérie *Erwinia amylovora* est responsable de la brûlure bactérienne chez les végétaux de la famille des Rosacées. Au Québec, cette bactérie affecte les cultures fruitières (pommier, framboisier) et ornementales (*Cotoneaster*, *Crateagus*, *Sorbus*....).



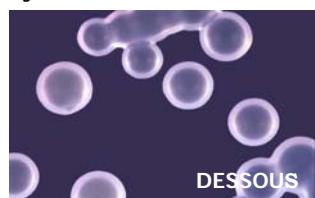
Dans les vergers, les pomiculteurs peuvent avoir recours à la streptomycine, antibiotique homologué chez le pommier, pour lutter contre cette maladie. Il est connu que les bactéries peuvent développer de la résistance aux antibiotiques. Ainsi, à la suite d'une consultation de références scientifiques et de personnes ressources, le Laboratoire de diagnostic en phytoprotection a introduit, parmi ses techniques, un test permettant de vérifier la résistance de *Erwinia amylovora* à la streptomycine. Ce service permet aux pomiculteurs d'optimiser leur lutte contre cette maladie en s'assurant que les souches de *Erwinia amylovora* présentes dans leurs vergers ne sont pas résistantes à l'antibiotique.

La présente information a pour objectif de vous présenter la méthode que nous utilisons pour déterminer la sensibilité ou la résistance de *Erwinia amylovora* à la streptomycine.

ISOLEMENT SUR MILIEU DE CULTURE

La première étape consiste à isoler la bactérie des tissus végétaux soit les fleurs, les pousses annuelles, les branches ou les fruits. Les isolements sont réalisés sur un milieu de culture différentiel connu sous le nom de CCT (Ishimaru, C. et E.J. Klos, 1984). Par la suite, l'identification des bactéries isolées est réalisée à partir du système [API 20E](#) (Mergaert, J. et al. 1984; Vantomme, R. et al. 1984).

Les colonies de *Erwinia amylovora* sur le milieu CCT ont une coloration bleu pâle et leur apparence est particulièrement convexe. Vues de dessous, elles montrent une marge opaque et un centre clair avec de fins rayons.



TEST DE RÉSISTANCE

À la suite de la confirmation de l'identification de *Erwinia amylovora*, la bactérie est mise en culture pure sur le milieu B de King (King, E.O., M.K. Ward et D.E. Raney, 1954).

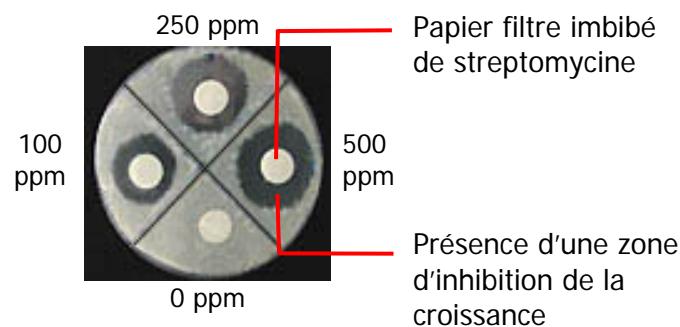
PRÉPARATION DES MILIEUX DE CULTURE ET DES DISQUES DE PAPIER FILTRE

Des milieux de culture B de King contenant de la streptomycine à diverses concentrations (0 ppm, 100 ppm, 250 ppm et 500 ppm) sont préparés 24 à 72 heures à l'avance.

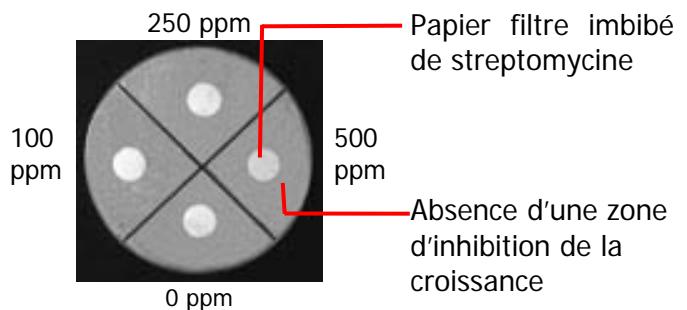
Des solutions de streptomycine à diverses concentrations soit 100 ppm, 250 ppm et 500 ppm sont préparées. Des disques de papier filtre (diamètre de 12,7 mm) sont imbibés de la solution de streptomycine juste avant leur utilisation. Pour ce faire, déposer sur des disques individuels 50 µl de chacune des solutions de streptomycine. Déposer 50 µl d'eau distillée stérile pour la concentration 0 ppm de streptomycine. Laisser sécher 1 heure à la température de la pièce sous une hotte.

TEST DE RÉSISTANCE PAR ZONE D'INHIBITION DE LA CROISSANCE

À partir d'une culture pure de *Erwinia amylovora* de 24 heures, une suspension bactérienne ayant une concentration de 10^8 bactéries/ml (standard McFarland No 5) est réalisée dans 2 ml de saline stérile (NaCl à 0,85%). Par la suite, 100 µl de la suspension bactérienne sont étalés sur un milieu B de King à l'aide d'une tige de verre stérile. Cette façon de procéder permet à la bactérie de croître sur toute la surface du milieu de culture. Quatre disques de papier filtre, contenant chacun une concentration prédéterminée de streptomycine (0, 100, 250 et 500 ppm), sont déposés sur le milieu de culture. Les milieux sont alors incubés à 26°C pour 24 à 72 heures. À la suite de l'incubation, il y a notation de la présence ou de l'absence d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne à la périphérie des disques de papier filtre (figure 1).



Isolat X: puisqu'il y a présence d'une zone d'inhibition de la croissance (zone sans croissance bactérienne à la périphérie des disques de papier filtre imbibé de streptomycine), **l'isolat X est sensible à la streptomycine**.



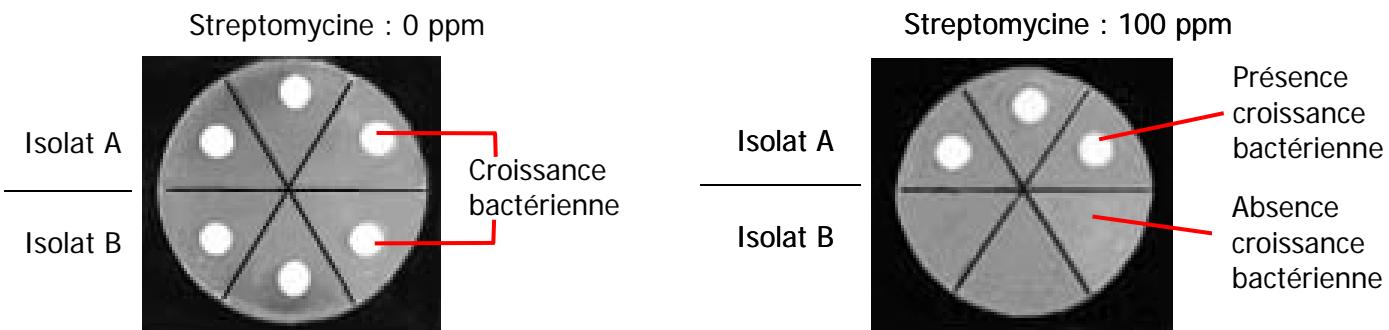
Isolat Y: puisqu'il y a absence d'une zone d'inhibition de la croissance (la zone de croissance bactérienne touche aux disques de papier filtre imbibé de streptomycine), **l'isolat Y est résistant à la streptomycine**.

Figure 1. Illustrations des résultats du test de résistance par zone d'inhibition de la croissance

TEST DE RÉSISTANCE PAR INOCULATION PONCTUELLE

À partir d'une culture pure de *Erwinia amylovora* de 24 heures, une suspension bactérienne ayant une concentration de 10^8 bactéries/ml (standard McFarland No 5) est réalisée dans 2 ml de saline stérile (NaCl à 0,85%). Par la suite, 10 µl de la suspension bactérienne sont déposés en un seul point sur un milieu B de King contenant de la

streptomycine à diverses concentrations soit : 0 ppm, 100 ppm, 250 ppm et 500 ppm. Les milieux de culture sont alors incubés à 26°C pour 24 à 72 heures. À la suite de l'incubation, il y a notation de la présence ou de l'absence d'une croissance bactérienne sur le milieu de culture (figure 2).



Présence d'une croissance bactérienne pour les isolats A et B sur le milieu de culture à la suite d'une inoculation ponctuelle avec 10 µl d'une suspension bactérienne de *Erwinia amylovora*. Le milieu de culture contient 0 ppm de streptomycine.

L'isolat A est résistant à la streptomycine car il y a une croissance sur le milieu de culture contenant 100 ppm de streptomycine.

L'isolat B est sensible à la streptomycine car il y a absence d'une croissance sur le milieu de culture contenant 100 ppm de streptomycine.

À noter que les deux isolats ont été inoculés sur le milieu de culture par une inoculation ponctuelle avec 10 µl d'une suspension bactérienne de *Erwinia amylovora*.

Figure 2. Illustrations des résultats du test de résistance par inoculation ponctuelle

RÉFÉRENCES

- Burr, T.J., J.L. Norelli, B. Katz, W.F. Wilcox et S.A. Hoying. 1988. Streptomycin resistance of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* in apple orchards and its association with a conjugative plasmid. *Phytopathology* 78 :410-413.
- Chiou, C-S et A.L. Jones. 1995. Molecular analysis of high-level streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 85 :324-328.
- Ishimaru, C. et E.J. Klos. 1984. New medium for detecting *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. *Phytopathology* vol. 74: 1342-1345.
- King, E.O., M.K. Ward et D.E. Raney. 1954. Two simple media for determination of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44: 301-307.
- Loper, J.E. et M.D. Henkels. 1991. Evaluation of streptomycin, oxytetracycline and copper

resistance of *Erwinia amylovora* isolated from pear orchards in Washington state. *Plant disease* 75 :287-290.

Mergaert, J., L. Verdonck, K. Kersters, J. Swings, J.-M. Boeufgras and J. De Ley. 1984. Numerical taxonomy of *Erwinia* species using API systems. *Journal of General Microbiology* 130 : 1893-1910.

Sherman, V.T. 1986. Testing for streptomycin resistance in *Erwinia amylovora* dans Methods for evaluating pesticides for control of plant pathogens. APS Press. P.76-78.

Sholberg, P.L., K.E. Bedford, P. Haag, et P. Randall. 2001. Survey of *Erwinia amylovora* isolates from British Columbia for resistance to bactericides and virulence on apple. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23 :60-67.

Vantomme, R., C. Rijckaert, L. Verdonck, J. Mergaert, J. Swings and J. De Ley. 1984. L'identification d'*Erwinia amylovora*. *Revue de l'Agriculture* 37 : 1158-1161

Les photos de ce document ont été réalisées par Chantal Malenfant, technicienne au Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, MAPAQ.