

# Identification des *Erwinia* responsables de la pourriture molle des pommes de terre vendues sur le marché de Médina Coura (Bamako)

Moussa BOIRE, Lassana B TRAORE

[boiremou@yahoo.fr](mailto:boiremou@yahoo.fr)

**RESUME :** Notre étude a concerné l'isolement et la caractérisation de *Erwinia* dans les pommes de terre. Au total, trente (30) échantillons de tubercules de pomme de terre infectés ont été prélevés sur le marché de soukouni koura à Bamako-Mali. La période d'étude est comprise entre Septembre 2016 et Avril 2017. Ces échantillons ont été collectés dans les magasins de pommes de terre. Le Pectate Violet Cristal (CVP) a été utilisé comme support de diagnostic sélectif pour isoler et purifier *Erwinia* dans les conditions spécifiques nécessaires (température et période de croissance, etc.). Les souches des isolats de *Erwinia* ont été caractérisées selon les caractéristiques morphologiques et microscopiques et les tests biochimiques. Nous avons obtenu les résultats suivants :

- Les isolats de *Erwinia* ont révélé que la température à 30 °C et le pH (7,4) étaient appropriés pour obtenir une croissance profuse de *Erwinia*.
- Les tests biochimiques ont montré que les souches *Erwinia* ont une réaction positive pour Catalase, Mannitol, Citrate de Simmons, TS, Urée, et une réaction négative pour l'oxydase, l'indole et H<sub>2</sub>S. Cela signifie que tous les isolats isolés étaient deux espèces *Erwinia carotovora* et *Erwinia chrysanthemi*.
- Les tests de détermination de la virulence des souches locaux de *Erwinia* ont été déterminés par la culture des souches locaux de *Erwinia* sur le milieu PDA. Ils ont été encore testés sur les tranches de tubercules de pommes de terre pour montrer leur efficacité à infecter les pommes de terre.

**Mots clés :** *Erwinia*, isolement, caractérisation, pourriture molle, pomme de terre

## I-INTRODUCTION

La pomme de terre occupe une place importante dans le système alimentaire mondial. Elle est la principale denrée alimentaire non céréalière du monde. Le Mali est le pays le plus grand producteur de pommes de terre en Afrique de l'Ouest francophone avec 114.478 tonnes soit 70% (FAO, 2007). La principale zone de production de pomme de terre au Mali est Sikasso avec plus des ¾ de la production nationale puis la zone de koulikoro surtout à Banguineda et kati (Diakité et Zida, 2003). Cependant le Mali importe des pommes de terre et Il arrive que des quantités importantes de pomme de terre proviennent de l'étranger particulièrement du Maroc (AIPAAM, 2016). Ces pommes de terre coûtent moins cher que celles produites au Mali. La contrainte majeure qui se pose à la production nationale de la pomme de terre est le coût élevé des intrants en général et la semence en particulier. Une autre contrainte non moins importante est sa conservation (Diakité et Zida, 2003). En effet, l'une des contraintes liées à la conservation des tubercules est la présence des germes pathogènes (bactéries, champignons, virus et parasites). Dans l'inventaire des maladies de légumes au Mali, les germes responsables de la pourriture molle de terre sont *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* et l'*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (THERA, 2000).

D'après une prospection dans le marché, il a été constaté que la plupart des pourritures rencontrées sur le marché de Médine Coura est la pourriture molle d'où le choix de ce thème.

## 2-Méthodes

### 2.1-Echantillonnage

Notre étude concernait un marché du district de Bamako plus précisément le marché de Médine (soukounikoura) où la commercialisation de pomme de terre est très importante. Elle a eu lieu entre le mois de Novembre et Mai 2017, période de stockage et vente de pommes de terre.

Les prélèvements ont été effectués dans 4 entrepôts différents dont les pommes de terre proviennent de Sikasso, Kati, et Niono. Les entrepôts ont été numérotés de A à C et dans chaque entrepôt, 10 échantillons ont été prélevés. Lors que nous sommes arrivés sur le terrain, nous avons trouvé que les vendeurs avaient déjà séparé les pommes de terre pourries des pommes de terre saines. Alors, seules les pommes de terre présentant la pourriture molle ont été considérées. Il s'agit des petites tâches diffuses d'aspect grasseux qui commençaient généralement à apparaître autour des lenticelles, des blessures ou du talon. Dans d'autres cas, l'infection est stoppée et la zone malade se dessèche, laissant une zone creuse

remplie d'une masse de matériel mort, dur et noir Les parties pourries produisaient des odeurs nauséabondes très prononcées. La pourriture souple des tubercules varie d'une légère décoloration vasculaire à une désintégration complète.

En plus, les échantillons ont été collectés dans des paniers stériles sans trace de produits chimiques puis transportés au LABOREM à la Faculté des Sciences et Techniques (FST).

## 2.2-Isolement des Pectobactéries

### 2.2.1-Préparation des échantillons

Les échantillons ont été préalablement lavés avec l'eau et du savon afin d'éliminer toute contamination possible, puis laisser sécher à la température ambiante.

### 2.2.2-Préparation des milieux de culture au laboratoire

#### 2.2.2.1-Le milieu Crystal Violet Pectate (CVP) (Hyman et al., 2001)

Le milieu Crystal Violet Pectate est formé par deux (2) couches différentes dont les préparations sont les suivantes

#### La couche basale

Les milieux DL-CVP ont été préparés d'après Pérombelon et Burnett (1991) et Cazelles et al. (1995), avec quelques modifications. Le mélange de la couche basale a été préparé dans 1 L d'eau distillée en ajoutant séquentiellement les ingrédients selon la recette suivante: 5,5 g de CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 1 g de triptonne, 1,5 mL de cristal violet (solution à 1, 1%), 1, 6 g de NaNO<sub>3</sub> et 15 g d'agar.

Après, la couche basale a été stérilisée par autoclave pendant 15 min à 120 ° C et refroidie jusqu'à 45-50 ° C. La couche inférieure a été coulée dans des boites de Pétri (15 mL / boîte) puis séchée sous la hotte linaire.

#### La couche supérieure (DL-CVP)

La surcouche contenait :2 mL de 5,5% d'EDTA (pH 8 • 0), 2 mL de NaOH (5 m) , 20 g de pectine et 800 ml d'eau distillée.

La préparation de la couche supérieure était similaire à celle décrite par Dr. Valérie Hélias et al. Nous avons dissous 20 g de pectine dans 100 ml d'eau distillées avec précaution pour éviter la formation des bulbes. A la différence de la couche basale, le mélange superposé a été bouillie jusqu'à 100°C, puis autoclaver à 120 ° C pendant 15 min. Le pH du

milieu a été vérifié à 6,8-7,4 avant de distribuer dans les boites de pétri. Lorsque la couche basale était ferme et sèche, 7ml de couche superficielle a été coulé sur le dessus.

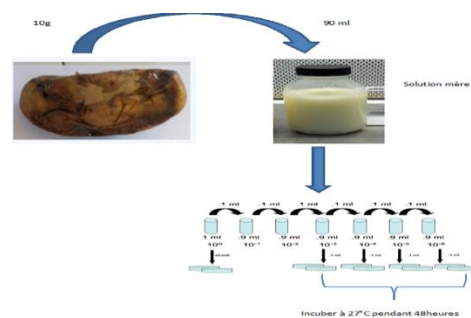
### 2.2.2.2-Préparations du milieu PDA

Le milieu PDA a été préparé avec 200 g de pomme de terre non épluchée, 15 g d'agar, 2,5 g de glucose et 1000 ml d'eau distillée. Nous avons coupé la pomme de terre non pelée en petits morceaux et pesé 200 g. Puis l'infusé dans 1 000 ml d'eau distillée. Après l'infusion, le volume de liquide a été encore complété à 1 000 ml et le pH a été ajusté à 7,4 avec de le NaOH 1N. Après nous avons ajouté 2,5 g de glucose et 15 g d'agar. L'effluent de pomme de terre a été bien homogénéisé jusqu'à la dissolution complète de l'agar puis bouilli. Ensuite, il a été autoclavé pendant 15 minutes à 121°C. Après nous avons distribué le milieu dans des boites de Pétri en raison de 20ml/boite.

## 2.3-Obtention et dénombrement des isolats

### 2.3.1-Dilution

Les tubercules préalablement lavées ont été coupées longitudinalement avec un couteau stérile puis la partie pourrie a été jetée. Un gramme de la partie active a été broyé dans mortier stérile. Le broyat a ensuite été dilué dans 9 ml d'eau physiologique constituant ainsi la solution mère. Au bout des 30 minutes, nous avons réalisé une série de dilutions décimales jusqu'à 10<sup>-6</sup>.



**Image 1 :** Préparation de solution mère et dilution décimale

### 2.3.2-Ensemencement

Un (1) ml de chaque dilution a été étalé sur le milieu CVP. Pour chaque dilution, deux répétitions ont été effectuées. 1 ml de solution a été prélevé dans chaque dilution à l'aide d'une micropipette puis déposé sur le milieu CVP. Après les boites ont été incubées à 35 °C pendant 48 heures. Au bout des 48 h, les colonies apparues ont été dénombrées.

### 2.3.3-Dénombrement

Les colonies ont été dénombrées par comptage.

### 2.3.4-Repiquage des isolats sur le milieu Crystal Violet Pectate

Une fois dénombré, les isolats ont été repiqués Crystal Violet Pectate et Potato Dextrose Agar (PDA) dans l'intention de réaliser la coloration de GRAM et d'autres tests.

## 2.4-Identification des isolats

Les isolats ont été identifiés en fonction des tests morphologiques et biochimiques comparés avec celui réalisé par Cuppels et kelman (1974) et Perombelom et Van der Wolf (2002).

### 2.4.1-Observation microscopique

La coloration de Gram a été réalisée pour une observation microscopique de la forme et la coloration des bactéries présentes dans la colonie.

### 2.4.2-Tests biochimiques

Les tests biochimiques suivants ont été déterminés conformément aux travaux effectués par Cuppels et kelman en 1974 et Perombelom et Van der Wolf en 2002 :

Test oxydase (Perombelom et Van der Wolf, 2002) / (HiMedia Laboratories)

La réaction de l'oxydase a été effectuée en prélevant et étalant une colonie bien isolée sur le milieu de culture. La réaction a été observée dans les 5-10 secondes.

Test catalase (Perombelom et Van der Wolf, 2002)

Une colonie bien isolée a été prélevée et mélangée avec une goutte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% fraîchement préparé sur une lame. La formation de bulles de gaz indique une réaction positive

Test Urée indole

Nous avons mis en suspension 30 g du milieu dans 1 l d'eau distillée. Après avoir bien mélangé, nous avons ajouté 10 ml de 95% d'éthanol. Ensuite, nous avons partagé 5 ml dans des tubes stériles. Les tubes n'ont pas été chauffés, ni stérilisés.

Test Triple Sugar Iron Agar

64,6 g du milieu a été mis en suspension dans 1 litre d'eau distillée. Après il été bien mélangé et dissous en chauffant avec agitation fréquemment. Ensuite, nous avons bouillie le milieu pendant une minute

jusqu'à dissolution complète et stérilisé à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. Le milieu de départ est translucide et rouge.

Test Citrate de Simmons

Nous avons mis en suspension 24,3 g du milieu dans 1 litre d'eau distillée. Puis bien mélangé et chauffé en agitant souvent jusqu'à ébullition et dissolution complète. Après nous avons repartis dans des tubes stériles et stérilisé en l'autoclave en position inclinée (de manière que le fond du tube atteigne une profondeur de 1,0 à 1,5 ml). La couleur du milieu était verdâtre.

Test Mannitol Nitrate, Mobyli Medium

Nous avons dissous 22 g du milieu dans 1 l d'eau distillée. Nous avons mélangé et dissous en chauffant avec agitation fréquente. Ensuite, nous avons bouillie pendant une minute jusqu'à la dissolution complète du milieu. Le milieu a été partagé dans des tubes. Puis, stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. La couleur du milieu était rouge au départ.

## 2.5- Pathogénicité des Erwinia isolés

### 2.5.1- Test de pathogénicité sur le milieu PDA

Les deux (2) souches ont été testées en utilisant le milieu PDA préparé en 2.2.2.2. Une colonie de chaque souche a été placée sur une boîte contenant le milieu PDA tout en répétant, puis incubé à 30°C pendant 24 h.

### 2.5.2- Test de pathogénicité sur les tranches de pomme de terre

L'essai réalisé pour déterminer la pathogénicité des isolats a été porté sur des tranches de pomme de terre. Pour cet essai, les 2 isolats ont été inoculés sur des tranches de pomme de terre puis incubé à 30°C pendant 3 jours, après les diamètres ou zones de destruction ont été mesurés.

En effet, neuf (9) tranches de pommes de terre ont été coupées, puis placées dans les boîtes de Pétri. Ensuite, chaque isolat a été testé sur les 9 tranches en tenant compte des témoins tout au long de l'expérience. Concernant les tranches de pomme de terre, il est à noter que chaque tranche de pomme de terre provenait d'un tubercule sain et les inocula ont été placés de façon successive.

Avant le découpage des tubercules, ils ont été préalablement nettoyés et le protocole utilisé a été inspiré de celui de Haynes et al. (1997). Les tubercules sont d'abord lavés avec du savon puis stérilisés en surface par trempage dans de l'éthanol à

70 % et bref passage sous la flamme d'un bec Bunsen. Une tranche, d'environ 5 mm d'épaisseur, est coupée au centre du tubercule, puis placée dans une boîte de Pétri. Un morceau d'inoculum de chaque souche est placé sur une même tranche de tubercule en laissant la partie du témoin. La boîte est ensuite entourée avec du Parafilm pour limiter les échanges gazeux et incubée dans une étuve à 30 °C pendant 48 heures.

## V-RESULTATS

### 1-Symptômes

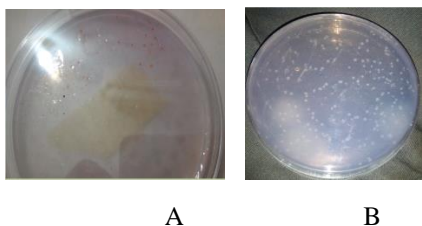
Les symptômes observés sur les tubercules se caractérisent par des pourritures molles. Certains tubercules étaient totalement pourris par contre d'autres parties étaient seulement contaminées comme indique l'image 6



**Image 2 :** Pommes pourries récoltées sur le marché de Medina koura

### 2-Résultat de l'isolement des Pectobactéries

Après 48 heures d'incubation, les colonies ont apparues sur le milieu CVP sous formes de cavités comme indique l'image ci-dessous. Elles se présentaient sous deux couleurs différentes : rouges et blanches (image 7).



**Image 3 :**

(A) Cavités rouges sur CVP

(B) Cavités claires sur CVP

Parmi les trente (30) échantillons ensemencés, 10 échantillons ont poussés. Cependant, sur les 10 aussi, deux échantillons présentaient à la fois des colonies claires et rouges. Les autres boîtes avaient uniquement des colonies claires.

Le dénombrement des cavités pour chaque tubercule a été effectué et les résultats sont regroupés dans le tableau3.

**Tableau 1 :** Dénombrement des cavités apparues sur le milieu Crystal Violet Pectate (CVP)

Echantillon	Concentration en Microorganisme UFC/g	Echantillon	Concentration en Microorganisme UFC/g
E1	2,14.10 <sup>5</sup>	E16	00
E2	2,40.10 <sup>5</sup>	E17	1,76.10 <sup>5</sup>
E3	00	E18	00
E4	00	E19	00
E5	00	E20	00
E6	00	E21	00
E7	2,56.10 <sup>5</sup>	E22	0,39.10 <sup>5</sup>
E8	4,09.10 <sup>5</sup>	E23	0,87.10 <sup>5</sup>
E9	00	E24	00
E10	2,60.10 <sup>5</sup>	E25	3,98.10 <sup>5</sup>
E11	00	E26	00
E12	00	E27	00
E13	00	E28	00
E14	00	E29	1,89.10 <sup>5</sup>
E15	00	E30	00

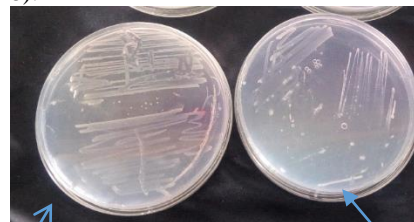
L'analyse de ce tableau montre une forte concentration des microorganismes au niveau des échantillons (E8 et E25) avec respectivement 4,09.10<sup>5</sup> et 3,98.10<sup>5</sup>. Des concentrations moyennes de 2,60.10<sup>5</sup> à 2,14.10<sup>5</sup> ont été observées au niveau de 4 échantillons : E10, E7, E2 et E1. D'autres concentrations plus faibles ont été notées dans les échantillons E17, E22, E23 et E29. Pour les autres échantillons, aucun microorganisme n'a été observé

### 2.1-Observations macroscopiques

Toutes les cavités avaient un même aspect mais de couleurs différentes. Certaines cavités se présentaient en couleur rouge tandis que d'autres étaient blanchâtres. Ceci a abouti à l'obtention de deux souches : cavité claires (ER1) et cavité rouge (ER2)

### 2.2-Purification des souches

Les deux (2) souches obtenues ont été repiquées sur le milieu Crystal Violet Pectate pour purification (image 8).



**ER2**

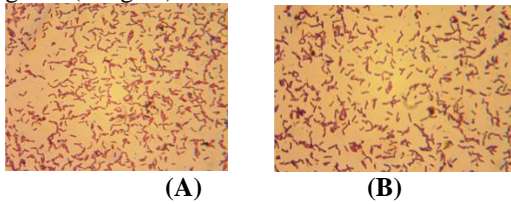
**ER1**

**Image 4:** Les souches repiquées (A)-Cavité rouge (ER2) sur CVP (B)-cavité blanches (ER1) sur CVP

### 3-Résultat de l'identification des isolats

#### 3.1-Test morphologique

Examen microscopique des deux isolats montre que tous les isolats ont la forme de bacilles Gram négatifs (image 9).



**Image 5 :** Bactéries

(A)-Bactéries provenant des colonies blanches

(B)-Bactéries provenant des colonies rouges

#### 3.2-Tests biochimiques

##### 3.2.1-Test de catalase :

Après l'ajout de l'eau oxygénée, il y'a eu immédiatement une ébullition, ceci indique que le test de la catalase est positif (image 10).



**Image 6 :** Test de catalase

##### 3.2.2-Test d'oxydase

Après cinq (5) secondes, nous n'avons constaté aucun virement de couleur. Donc, ce qui prouve que le test à l'oxydase est négatif (image 11).



**Image 7:** Test d'oxydase

##### 3.2.3-Test Urée-Indole

Après 24 h d'incubation, l'urée et indole étaient tous négatifs. Ensuite une goutte de réactif de Kovac a été ajoutée pour la révélation de l'indole. Il a été constaté, contrairement aux colonies blanches, non seulement un virage de la couleur jaune à la couleur orange, mais également la formation d'anneaux sur les colonies rouges. Par conséquent, nous pouvons dire que l'urée et l'indole sont négatifs sur les colonies blanches par contre l'urée est négative mais il y'a production d'indole chez les colonies rouges (image 12).



ER2

ER1

**Image 8:** Production indole

##### 3.2.4-Test Triple Sugar Iron Agar

Au bout de 24 heures d'incubation, nous avons assisté au virage de la couleur du milieu en jaune avec production de gaz et l'absence de couleur noirâtre. Ce qui nous montre qu'une fermentation &&s'est produite donc l'acide a été produit. La bactérie est alors anaérobie facultative.

##### 3.2.5-Test Citrate de Simmons

Au bout de 24 heures d'incubation, il y'a changement de la couleur du milieu vers le bleu (citrate+). Toutefois, ce sont des bactéries qui utilisent le citrate comme seule source de carbone. Donc, le test au citrate de Simmons est positif.

##### 3.2.6-Test Mannitol Nitrate, mobilité dans le milieu de culture :

Après 24 heures d'incubation, il y'avait le virage de couleur du milieu de rouge en jaune. En plus les colonies étaient réparties dans le milieu, ce qui montre non seulement la dégradation du mannitol mais aussi la mobilité des bactéries sur le milieu (image 13).



**Image 9 :** Galerie biochimique classique

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 4.

**Tableau 2 :** Caractères biochimiques des isolats d'*Erwinia*

Caractères biochimiques	ER1	ER2
Croissance à 35°C	+	+
Catalase	+	+
Oxydase	-	-
Glycose	+	+
Saccharose	+	+
Lactose	+	+
Gaz	+	+
Mobilité	+	+
Mannitol	+	+
Urée	-	-
Indole	-	+
Citrate Simon	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-

Seuls les tests indole, H<sub>2</sub>S et Oxydase ont donné un résultat négatif.

En conclusion, tous les échantillons ont été cultivés sur le milieu semi-sélectif Crystal Violet Pectate (CVP), qui favorise uniquement la croissance des Pectobactéries et *Dickeya*. En incubant à 30°C pendant 48 heures, compte tenu de l'aspect des colonies sur le Milieu CVP, qui se présente sous forme de cavité et en se référant sur les résultats de la coloration GRAM et les tests biochimiques, nous pouvons affirmer que les cavités blanches (ER1) correspondent *Erwinia carotovora* et les cavités rouges (ER2) à *Erwinia chrysanthemii*.

#### 4-Pathogenicité des souches d'*Erwinia*

##### 4.1-Test sur le milieu PDA

Après 24 heures d'incubation, les résultats se présentent comme suit (image 14) :



**Image 10 :** *Erwinia* sur le milieu PDA

(A)-*Erwinia carotovora*

(B)-*Erwinia chrysanthemii*

Les deux isolats locaux d'*Erwinia* testés en utilisant le milieu PDA ont prouvé l'existence d'activités pectolytiques. Sur le milieu PDA, les jeunes colonies sont circulaires, convexes, lisses et entières, ou sont sculptés avec des marges irrégulières, en fonction de la teneur en humidité du milieu de croissance.

##### 4.2-Test de pathogénicité sur les tranches de pomme de terre

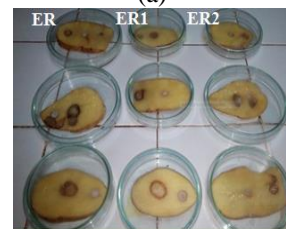
Les résultats obtenus dans l'essai nous enseignent que le développement de pourritures sur les tranches de pommes de terre est éminemment variable. Les parties du témoin n'ont pas développé de pourritures, preuve que les tubercules utilisés étaient sains. Considérant l'ensemble des répétitions aux essais (A, B et C), on a constaté des différences d'agressivités entre les isolats. L'isolat d'*Erwinia chrysanthemii* agresse moins que l'isolat d'*Erwinia carotovora*.

La pathogénicité a été déterminée en fonction du temps

- Après 24 heures d'incubation des tranches de pommes de terre, nous avons obtenu des résultats suivants (image 15):



(a)



(b)



(c)



(d)

**Image 11 :** Diamètres d'agressivité des pommes de terre.

- (a) Pommes non inoculées.
- (b) Diamètre d'agressivité à 24 h
- (c) Diamètre d'agressivité à 48 h
- (d) Diamètre d'agressivité à 72 h

Les diamètres de destruction ont été mesurés et les valeurs sont regroupées dans le tableau 5.

**Tableau 3:** Diamètres de destruction des pommes de terre après 24 h, 48 h et 72 h.

N° Rép é titi on	Erwinia colonies blanches /cm			Erwinia colonies rouges /cm			Té moi n
	24 H	48H	72 H	24H	48H	72H	
R1	1,1	2,1	N M	1,0	1,8	NM	0
R2	2,1	3,8	N M	1,0	1,5	NM	0
R3	1,5	3,0	N M	0,8	1,5	NM	0
R1'	1,7	4,0	N M	0,8	2,0	NM	0
R2'	1,1	3,0	N M	0,7	1,5	NM	0
R3'	2,0	3,5	N M	1,1	1,8	NM	0
R1''	1,3	2,0	N M	0,9	2,5	NM	0
R2''	2,2	3,8	N M	0,9	2,5	NM	0
R3''	2,2	3,0	N M	2,0	3,5	NM	0
Mo yen ne	1,6	3,1	N M	0,9	1,8	NM	0

NM : Non mesurable

En 24 heures seulement, *Erwinia carotovora* a présenté un taux de destruction assez élevé contrairement à l'*Erwinia chrysanthemie* et à 48 heures l'impact de *Erwinia carotovora* est beaucoup plus importante.

## VI-DISCUSSION

Cet essai nous a permis d'isoler *Erwinia carotovora sub carotovora* et *Erwinia chrysanthemie* parmi les trente (30) échantillons de tubercules de pomme de terre prélevés dans le marché de Medine dans la ville de Bamako. Les tubercules présentant les symptômes de pourriture molle ont été collectés. Ce résultat était conforme à celui de Powelson & Franc en 2001.

Le milieu Crystal Violet (CVP), nous a permis d'isoler et purifier les isolats d'*Erwinia Carotovora* et *Chrysanthemie* conformément aux résultats obtenus par Cuppels and Kelman en 1974.

De plus, nous avons énuméré les *Pectobacterium* spp. Et *Dickeya* spp. qui ont été observées, grâce aux cavités distinctives qu'elles y forment suite à la production importante d'enzymes pectinolytiques

d'après Pérombelon et Burnett, 1991; Hyman et al., 2001; Hélias et al., 2012.

L'examen microscopique des isolats d'*Erwinia carotovora* et *chrysanthemie* sont apparus sous forme de bâtonnet en utilisant l'objectif (1000x) et la coloration de Gram était négative; ce résultat a été déjà rapporté par Pérombelon (2006).

Par ailleurs, notre a révélé qu'*Erwinia carotovora sub atroseptica* forme des cavités à 27°C uniquement tandis que *Erwinia carotovora sub carotovora* forme des cavités entre 27 et 33,5°C. Ces températures de croissance ont été également testées et approuvées par Pérombelon et al. (1987). Cependant, *Erwinia chrysanthemie* forme des cavités à toutes ces températures susmentionnées.

Les tests biochimiques utilisés nous ont permis d'identifier les isolats d'*Erwinia* dont le résultat est compatible avec celui de Pérombelon et Van der Wolf en 2002.

Les résultats de tests de pathogénicité réalisés sur des tranches de tubercule au Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Environnementale à la Faculté des Sciences et techniques se sont avérés positifs. Les isolats actifs ont été reconnus par l'apparition de pourritures douces. Ils ont été dispersés sur les tranches de tubercules inoculés. La température d'incubation a permis aux agents pathogènes de produire un certain nombre d'enzymes différentes pour favoriser l'infection. Le résultat est compatible avec celui de Pérombelon (1979); Pérombelon et Kelman(1980). La différence significative a été observée entre les isolats testés, en ce qui concerne la rapidité du développement des pourritures molles sur les tranches de tubercules. C'est *Erwinia carotovora sub carotovora* qui est le plus rapide puis qu'en 24heures de repiquage, il a colonisé pratiquement toutes les tranches de pommes de terre.

En fin, notre étude a montré que certaines pommes de terre présentaient les symptômes de pourriture molles, mais sans la présence aucun *Erwinia*. Ceux-ci confirment que d'autres germes causent la pourriture chez les pommes de terre qu'*Erwinia* comme *Bacillus pumulis* (Bathily et al, 2012).

Notre étude confirme que les germes responsables de la pourriture molle chez les tubercules récoltés sur le marché de Medina coura sont *Erwinia carotovora* (plus dévastateur) et *Erwinia chrysanthemie*. Ces germes ont été identifiés et caractérisés par les différents tests réalisés.

## VII. CONCLUSION GENERALE ET PERCEPTIVES

### ➤ Conclusion générale

La pourriture molle de la pomme de terre est une maladie d'importance mondiale, qui occasionne des pertes économiques considérables au stockage. En entrepôt, la température et la formation d'eau libre à la surface des tubercules de pomme de terre jouent un rôle majeur dans l'initiation et le développement de la maladie, provoquée par les deux espèces bactériennes étudiées à savoir *Pectobacterium carotovorum* et *Erwinia chrysanthemae*. La présente étude est une contribution à l'identification et caractérisation des Pectobactéries responsables de la pourriture molle chez les tubercules de pomme de terre. Alors, nous pouvons conclure qu'*Erwinia carotovora* et *Erwinia chrysanthemae* ont été isolés parmi les trente échantillons de tubercules de pomme de terre prélevés sur le marché de soukouni koura. Le Crystal Violet Pectate (CVP) nous a permis d'isoler et purifier *Erwinia*. L'identification d'*Erwinia*, en particulier les deux espèces *Erwinia carotovora* et *Erwinia chrysanthemae* a été réalisée selon les tests morphologiques et tests biochimiques. Les résultats montrent qu'ils sont à l'origine de la pourriture molle des tubercules de pommes de terre au Mali. Par ailleurs, *Pectobacterium carotovora*. et *Erwinia chrysanthemae* peuvent infecter simultanément les tubercules de pomme de terre en stockage.

#### ➤ Perspectives

Lors de notre étude, au moment de la collecte des échantillons, nous avons trouvé que les pommes de terre pourries provenant de localités différentes (Kati, Sikasso et Nioro) étaient regroupées ensemble jusqu'à ce que nous avons eu du mal à les différencier. Il serait intéressant de suivre la traçabilité de l'infection.

Au cours de cette étude, nous avons constaté que certains tubercules de pommes présentaient de pourritures molles sans la présence d'*Erwinia*. Il serait intéressant de déterminer les causes de ces pourritures molles.

Les moyens disponibles n'ont pas permis une identification plus poussée des Pectobactéries. D'autres travaux doivent être menés pour confirmer et renforcer les résultats déjà obtenus notamment l'utilisation de techniques immunologiques, moléculaires pour isoler les Pectobactéries du genre *Pectobacterium carotovora* et *Pectobacterium chrysanthemae*.

#### VIII-REFERENCES

[1] AUGUSTIN M A, 2012. Etude des facteurs écologiques influençant la croissance et le développement des *Pectobacterium spp.* infectant les tubercules de pomme de terre. Mémoire de Master. l'université de Liege. p 137.

[2] BAMANA A H, Bathily H, SAMAKÉ F, MAÏGA K, TRAORÉ D et DICKO A, 2011. Microbiological Control of Bacterial Soft Rot Caused by *Bacillus pumilus* Od23 on Potato. British Microbiology Research Journal.p.41-48.

[3] Bathily H, 2007b. Identification et caractérisation des microorganismes responsables de la pourriture molle de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) à Sikasso (Mali), Mémoire de DEA, Université de Bamako, p. 43.

[4] Bathily H, BABANA A H, SAMAKÉ F, Bouarab K, Beaulieu C, 2007a. Diversité biologique des bactéries responsables de la pourriture molle de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) en entrepôt au Mali. Rapport du Colloque International sur la gestion des ressources génétiques en zone de savanes d'Afrique de l'Ouest : «Agrobiodiversités», Bamako-Mali. p. 2067-2071.

[5] Centre pour le Développement de l'Entreprise (CDE), 2009. Guide technique de la culture de la pomme de terre en Afrique de l'Ouest. p.80.

[6] DYE, D.W, 2012. A numerical taxonomic study of the genus *Erwinia*. p 223-229

[7] Elizabeth Ngadze Carrie L. Brady, Teresa A. Coutinho, and Jacquie E. van der Waals ISHIMARU, C. and E.J. KLOS, 1984. New medium for detecting *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. Phytopathology vol.74:1342-1345.

[8] HILDEBRAND, D.C., 1971. Pectate and pectin gels for differentiation of *Pseudomonas* sp. And other bacterial plant pathogens. Phytopathology 12: 1430-1436.

[9] [https://Wikipedia.org/wiki/pourriture\\_molle\\_bacterienne](https://Wikipedia.org/wiki/pourriture_molle_bacterienne).

[10] IPM CRSP Diagnostics Workshop, June 2011. IPM CRSP Tomato Disease and Insect Pest Diagnostics Workshop Biotechnology Centre, University of Ghana, Legon, p.20.

[11] Jean-Guy Parent, et al, 1996 . Identification of *Erwinia carotovora* from Soft Rot Disease Plants by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis.p 494-499

[12] L. Zhu<sup>1,2\*</sup>, H. Xie<sup>2\*</sup>, S. Chen<sup>1</sup> and R. Ma<sup>1,2</sup>. Rapid isolation, identification and phylogenetic analysis of *Pectobacterium carotovorum* ssp. Journal of Plant Pathology (2010). College of Biological Sciences, China Agricultural University.479p

[13] Lamissa Diakité, Mathurin Zida, 2003. Etude diagnostique de la filière pomme de terre dans trois pays de l'Afrique de l'Ouest. Volume II : Cas du Mali. Rapport final.p.71

[14] LELLIOOT,R.A., and R.S. DICKEY., 1984. Genus VII. *Erwinia* Winslow, Broadhurst,

- Buchanan, Krumweide, Rogers and Smith 1920, 209. p 469-476.
- [15] M. C. M. PEROMBELON & J. M. VAN DER WOLF (2002), Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovorasubsp. atroseptica*(*Pectobacterium carotovorumsubsp. atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual. p 82.
- [16] Maitham J. Mohammed and Ehab D. Selman, 2013. Detection of local *Erwinia* Isolates Causing Diseases in Potato by Using DNA Amplification by Polymerase Chain Reaction Technique (PCR). Journal of Al Nahrain University Vol.16 (3) p.224-229
- [17] Maitham Jamil Mohammed, (2013). Detection of *Erwinia spp.* on potato (*Solanum tuberosum L.*) using conventional and PCR Technique. Thèse de doctorat. University of Baghdad.p 113.
- [18] MILLER, T.D. and M.N. SCHROTH, 1972. Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with a selective medium. p 1182.
- [19] Mohamed Kettani Halabi, 2014. Etude de la diversité de *Pectobacterium spp* et des effets induits par les lipopolysaccharides chez les plantes. These de doctorat.p 219.
- [20] National Plant Diagnostic Network, version 2.3. Standard Operating Procedure for Plant Diagnostic Laboratories. Southern Wilt/Brown Rot *Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2.p 34
- [21] Ngadze E, et al, 2012. Pectinolytic bacteria associated with potato soft rot and Blackleg in south africa and Zimbabwe..p 533–549
- [22] Palacio-Bielsa, et al, 2006. Characterisation of potato isolates of *Dickeya chrysanthemi* in Spain by a microtitre system for biovar determination. Annals of Applied Biology, an international journal of the QQB. p 157-164.
- [23] R. Czajkowski, M.C.M. Pérombelon, S.Jafra, E. Lojkowska, M. Potrykus, J.M. van der Wol & W. Sledz (2014). Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot. Annals of Applied Biology. p 21
- [24] Robert Czajkowski Grzegorz J. Grabe Jan M. van der Wolf, 2009. Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in naturally infected seed potatoes. European Journal of Plant Pathology.p 263-275
- [25] SCHAAD, N.W., 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 2 and Edition. The American Phytopathological Society .p.53.
- [26] Steven Haggblade, Boubacar Diallo, Melinda Smale, Lamissa Diakité et BinoTémé, 2015. Revue du système semencier au Mali.p.64
- [27] T.Goszczyńska, J.J. Serfontein & S. Serfontein, 2000. Introduction to practical Phytobacteriology, p.91.
- [28] THERA Aissata TRAORE, 2007. Bacterial wilt management: a prerequisite for a potato seed certification program in Mali A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science In Plant Pathology montana state university Bozeman, Montana November 2007.p 142.
- [29] Thornley, M.J., 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram- negative bacteria on the basis of arginine metabolism. Journal of Applied Bacteriology, 23: 37-52.
- [30] V. Helias\*, P. Hamon, E. Huche, J.V. D. Wolf and D. Andrivon .Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya* . You have free access to this content. Plant Pathology Volume 61, Issue 2, and Version of Record online: 18 JUL 2011. 339 p
- [31] VANDERHOFSTADT Bruno, JOUAN Bernard et all, 2009. Centre pour le Développement de l'Entreprise, 2009. Guide technique de la culture de la pomme de terre en Afrique de l'Ouest. p.80
- [32] [www.afsca.be/productionvegetale/pommeterre/bacterienne](http://www.afsca.be/productionvegetale/pommeterre/bacterienne). Wikipedia.