

Caractérisation en biovars d'isolats marocains d'*Agrobacterium* issus de tumeurs racinaires des rosacées fruitières

A. Benjama¹ et S. Daoud²

¹ INRA, laboratoire de phytobactériologie, B.P. S/40, Meknès;

² Faculté des Sciences, Meknès, Maroc

(reçu le 7 juin 1988; accepté le 4 juillet 1989)

Résumé — Cette étude porte sur la caractérisation et le contrôle du pouvoir pathogène de 103 isolats d'*Agrobacterium* à partir d'une synthèse des tests différents proposés dans la littérature. Quarante-quatre souches d'*Agrobacterium* ont pu être alors identifiées dont 22 sont pathogènes. Les résultats montrent que les tumeurs à *Crown-gall* de l'amandier, du prunier et du pêcher de la région de Meknès, Maroc, contiennent des *Agrobacterium* pathogènes ou non pathogènes; le biovar 2 (26 souches dont 14 pathogènes) s'y trouve plus fréquemment que le biovar 1 (14 souches dont 8 pathogènes).

Une gamme de plantes indicatrices : tomate, tournesol, tabac permet de révéler une proportion d'agents pathogènes plus élevée que l'inoculation d'une seule espèce végétale.

crown-gall – amandier – prunier – pêcher – biovar

Summary — **Biovar characterization of moroccan *Agrobacterium* isolates originating from root tumors on deciduous fruit trees.** Determination of the physiological characters of *Agrobacterium* and ways of testing for pathogenicity vary from author to author. It was therefore necessary for a combination of tests to be followed in this study. 44 strains of *Agrobacterium* were identified, 22 of which are pathogenic. It has been shown, among the pathogenic and non-pathogenic strains in tumors of almond, plum and peach, that biovar 2 (26 strains) occurs more frequently than biovar 1 (14 strains) in the Meknès area.

When used together to check pathogenicity test-plants like tomato, sunflower and tobacco revealed more pathogenic bacteria than a single test plant.

crown-gall – almond – plum – peach – biovar

INTRODUCTION

La galle du collet ou *Crown-gall* des rosacées fruitières sévit au Maroc. L'importance et la répartition de cette maladie a été déjà décrite (Benjama *et al.*, 1987). La région de Meknès avec plus de 50% de la production arboricole nationale est la plus touchée. Les pépinières sont les principaux foyers de la maladie où le nombre de plants atteints de tumeurs provoquées par *Agrobacterium* peut atteindre 90%.

La taxonomie d'*Agrobacterium* a fait l'objet de beaucoup de controverses. Différents auteurs utilisent des appellations différentes. Allen & Holting (1974), mentionnent *Agrobacterium tumefa-*

ciens qui est synonyme d'*A. radiobacter* d'après Keane *et al.* (1970), White (1972), Kersters *et al.* (1973), Holmes & Roberts (1981). Ces derniers rejettent l'appellation *A. radiobacter* si *A. tumefaciens* est retenu comme espèce-type.

La nomenclature d'*Agrobacterium* était confuse, car basée sur le pouvoir pathogène qui est transférable de bactérie en bactérie (Kerr & Brisbane, (1983). D'après ces mêmes auteurs, *Agrobacterium* provoque deux maladies : la galle du collet (*Crown-gall*) et la galle chevelue (*Hairy-root*). Les trois espèces d'*Agrobacterium* (*A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi*) provoquent le *Crown-gall* si elles portent le plasmide Ti alors que seulement les deux premières espèces

donneraient le *Hairy-root* si elles portent le plasmide Ri.

Ce qui frappe, dans l'analyse de Kerr & Brisbane (1983) c'est qu'il n'est plus question de pathovar au sens de Kerr *et al.* (1978), ni de variété comme le préconisent Keane *et al.* (1970), New & Kerr (1972), Kerr & Panagopoulos (1977), Panagopoulos *et al.* (1978), mais de biovar d'après Kersters et De Ley (1984).

Ces différentes approches témoignent de la complexité du genre *Agrobacterium* et de son hétérogénéité. Les différents auteurs n'épousent pas souvent le même schéma d'identification ce qui laisse un doute sur la nomenclature à utiliser. Dans cette étude, il a été tenu compte de cette variabilité d'approche en adoptant les tests physiologiques communs utilisés par Keane *et al.* (1970), White (1972), Kerr (1974), Kerr & Panagopoulos (1977), Dhanvantari (1978), Spiers (1979), Schaad (1980), Miller & Vrugink (1981), Bazzi & Rosciglione (1982), Knaut *et al.* (1982), Kersters & De Ley (1984) (Tableau I). La caractérisation des isolats d'*Agrobacterium* en biovar est accompagnée du test de leur pouvoir pathogène sur plantes indicatrices et l'appellation de la souche pathogène sera conforme à celle proposée par Kersters & De Ley (1984).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Souches bactériennes

L'origine des souches bactériennes et leurs hôtes respectifs figurent dans le Tableau II. Elles sont isolées de tumeurs jeunes portées par les racines d'arbres âgés de 6 à 8 ans.

Tableau I. Synthèse des caractères physiologiques utilisés pour l'identification des biovars d'*Agrobacterium*.

Caractère	Biovar ₁	Biovar ₂	Biovar ₃
3-Cétolactose	+	-	-
Citrate de Na	-	+	+
NaCl 2%	+	-	+
Oxydase	+	V	V
T° max. de croissance	37 °C	29 °C	32 °C
Erythritol	-	+	-
Malonate	-	+	-
L+Tartrate	-	+	-

V : Variable; + : réaction positive; - : réaction négative.

Tests physiologiques

Tous les tests sont réalisés au laboratoire à 20 °C.

Production du 3-cétolactose

La méthode de Bernaerts & De Ley (1963) permet de distinguer les souches du biovar₁ d'*Agrobacterium* qui sont positives de celles du biovar₂ qui sont négatives.

Utilisation du citrate de sodium sur milieu de Simmons (1926).

Tolérance au chlorure de sodium

Le milieu de base est l'Agar nutritif (Nutrient broth 8g, gélose 15g par litre d'eau distillée) auquel on ajoute NaCl 2%. La croissance éventuelle est observée jusqu'à 5 j d'incubation.

Recherche de l'oxydase par la méthode de Kovacs (1956).

Température maximale de croissance

Les ensemencements bactériens sont placés à l'étuve à 27, 29, 37, 39 °C pendant 10 j.

Utilisation différentielle des sources de carbone

Le milieu d'Ayers *et al.* (1919) est utilisé comme milieu de base auquel on ajoute après autoclavage une solution stérilisée par filtration d'érythritol, glucose, saccharose, malonate ou L(+) tartrate pour obtenir une concentration finale de 0,1%.

L'observation de la croissance bactérienne se fait chaque j pendant une semaine.

Pouvoir pathogène sur plantes indicatrices

Des tranches de carotte sont inoculées par dépôt d'une suspension dense (10⁸ bactéries/ml) sur l'anneau vasculaire, puis maintenues en chambre humide à la température de 25 °C (Ark & Schroth, 1958). On note le développement des excroissances après 14 j.

Des jeunes plantes de tournesol, tomate et tabac sont utilisées au stade 3-4 feuilles. Des gouttes (1/20 ml) de suspension bactérienne de 10⁸ bactéries/ml sont déposées à 4 niveaux différents sur la tige blessée préalablement à l'aide d'une aiguille, à raison de 6 plantes par souche. Les jeunes plantes sont placées en chambre climatisée à 25 °C et 70 % d'humidité relative. Les résultats apparaissent au bout de 10 j pour le tournesol, 15 j pour la tomate et 30 j pour le tabac. Si la bactérie est pathogène, une tumeur se développe au niveau de la blessure.

Inoculation de *Kalanchoe* en vue de l'analyse des opines

Quelques souches d'*Agrobacterium* pathogènes du biovar₂ sont inoculées sur *Kalanchoe tubiflora* de la même manière que sur tomate, tournesol et tabac. Une fois les tumeurs bien développées, elles sont envoyées à l'institut de microbiologie d'Orsay en vue de l'analyse des opines.

Tableau II. Origine des souches d'*Agrobacterium*.

Plante hôte	N° Tumeur	N° Souche	Pays	Date	Fournie par
<i>Prunus amygdalus</i> (amandier amer)	121	AT 68	Grèce	1967	Garrett
		121.7 - 121.9 - 121.19 - 121.20 - 121.22 - 121.23 - 121.27 - 121.35 - 121.39 - 121.62 - 121.66 - 121.68 - 121.71 - 121.84 - 121.85 - 121.86 - 121.87 - 121.90	Maroc (Azrou)	1986	
	136	136.4	Maroc (Meknès)	1986	
<i>Prunus domestica</i> (myrobolan)	72	72.18	Maroc (Meknès)	1984	
	102	102.9	Maroc (Meknès)	1985	
	103	103.2 - 103.3 - 103.16 - 103.18 - 103.21 - 103.30 - 103.31 - 103.36	Maroc (Meknès)	1985	
	134	134.2 - 134.10 - 134.13	Maroc (Meknès)	1986	
	135	135.5	Maroc (Meknès)	1986	
<i>Prunus persicae</i> (missour)	141	141.1 - 141.5 - 141.10 - 141.11 - 141.12 - 141.13*	Maroc (Azrou)	1987	
	142	142.5 - 142.7 - 142.8	Maroc (Azrou)	1987	

(*) 141.13 : 2746 CFBP Collection française de bactéries phytopathogènes, INRA, Angers, France.

RÉSULTATS

Caractérisation des isolats d'Agrobacterium en biovar

Parmi 103 isolats étudiés, seules 44 souches répondent aux caractéristiques d'*Agrobacterium* : aspect des colonies à l'isolement, Gram-, non fluorescent, oxydatif. Elles sont classées en 3 biovars (Tableau III) : 15 souches (dont 9 pathogènes) en biovar₁, 26 souches (dont 14 pathogènes) en biovar₂; un biovar intermédiaire, répondant aux caractères des 2 biovars, a été appelé biovar₁₋₂; il comprend 3 souches non pathogènes.

Test du pouvoir pathogène des isolats d'Agrobacterium

Sur 44 souches bactériennes, seules 14 donnent des tumeurs sur tranches de carotte.

Sur tabac, 10 souches sont pathogènes, 17 sur tournesol et 21 sur tomate. Seulement 7 souches répondent positivement sur les 3 plantes (Tableau IV).

Analyse des tumeurs sur Kalanchoe

Les souches inoculées sur *Kalanchoe tubiflora* ont donné des tumeurs caractéristiques soit avec des petites racines sur toutes les tumeurs soit des bourgeons (Tableau V). Ces tumeurs analysées sont à Nopaline.

DISCUSSION

La caractérisation physiologique des *Agrobacterium* montre que la population bactérienne marocaine est variée et hétérogène. Le biovar₂ est dominant par rapport au biovar₁ comme c'est le cas en Australie (New & Kerr, 1972); en Grèce (Panagopoulos & Psallidas, 1973); aux Etats-

Tableau III. Classification en biovar des 44 souches d'*Agrobacterium*.

Biovar	N° de souche d' <i>Agrobacterium</i>	Total
Pathogène 1	At 68 - 72.18 - 103.30 - 103.31 - 103.36 - 121.62 - 121.68 - 141.1 - 141.5	9 (20%)
Non pathogène	103.2 - 121.19 - 121.27 - 136.4 - 141.10 - 142.5	6 (14%)
Pathogène 2	102.9 - 103.16 - 103.18 - 103.21 - 121.1 - 121.85 - 121.90 - 134.13 - 135.5 - 141.11 - 141.12 - 141.13 - 142.7 - 142.8	14 (32%)
Non pathogène	103.3 - 121.7 - 121.9 - 121.35 - 121.39 - 121.66 - 121.71 - 121.84 - 121.86 - 121.87 - 134.2 - 134.10	12 (27%)
Non pathogène 1-2	121.20 - 121.22 - 121.23	3 (7%)

Tableau IV. Réactions comparées de tomate, tournesol et tabac aux différentes souches d'*Agrobacterium*.

	Souches bactériennes	Pathogénicité sur			
		tomate	tournesol	tabac	total
	At 68* - 72.18 - 103.21* - 134.13* - 135.5* - 141.12** - 142.8*	+	+	+	7
<i>Agrobacterium</i> Pathogène	102.9 - 103.18* - 103.36 - 121.62* - 141.1 - 141.11 - 141.13* - 142.7*	+	+	-	8
	103.30 - 121.1* - 121.85*	+	-	+	3
	121.68* - 121.90 - 141.5	+	-	-	3
	130.16 - 103.31	-	+	-	2
<i>Agrobacterium</i> non pathogène	103.2 - 103.3 - 121.7 - 121.9 - 121.19 - 121.20 - 121.22 - 121.23 - 121.27 - 121.35 - 121.39 - 121.66 - 121.71 121.84 - 121.86 - 121.87 - 134.2 - 134.10 - 136.4 - 141.10 - 142.5	-	-	-	21

+ : Présence de tumeur; - : Pas de tumeur; * : Souches ayant donné des tumeurs sur tranches de carotte.

Unis (Anderson & Moore, 1979) et en France (Lopez, 1978). Cette hétérogénéité semble indépendante de l'origine de la souche puisqu'on trouve les biovars indifféremment sur prunier, amandier ou pêcher.

Le test du pouvoir pathogène des souches d'*Agrobacterium* nécessite plus d'une espèce

végétale indicatrice pour vérifier le pouvoir tumorigène. La tomate et le tournesol donnent des réponses positives pour toutes les souches pathogènes testées (Tableau IV). La carotte et le tabac donnent des résultats restrictifs. Il apparaît donc que le test sur carotte en boîte de Petri ou l'inoculation de plants de tabac ne sont pas

Tableau V. Inoculation des *Kalanchoe tubiflora* et analyse des opines.

Plante hôte	Biovar	N° souche	Résultats sur Kalanchoe*	Analyse des Opines**
<i>P. domestica</i>	2	102.9	+ BR	N
	2	103.16	+	
	2	103.21	+ BR	N
<i>P. amygdalus</i>	2	121.1	+ BR	N
	–	121.68		
	2	121.85	+ BR	N
	2	121.90	+ BR	N
<i>P. domestica</i>	2	134.13	+ R	N
	2	135.5	+ R	N
		141.5	+	
<i>P. persica</i>	2	141.11	+ R	N
	2	141.12	+ R	N
	2	147.7	+ R	N
	2	142.8	+ R	N

* – Test réalisé sur *Kalanchoe tubiflora* selon Paulus *et al.*, 1989.

N – Tumeur analysée à Nopaline; B – Tumeur avec bourgeons; R – Tumeur avec racines.

** – Analyse réalisée par le : Groupe de recherche interactions micro-organismes-plantes (Annick Petit). Université Paris XI. Institut de microbiologie, 91 405-Orsay.

fiables. Dans notre expérience, c'est le test d'inoculation sur tomate qui donne la réponse la plus large (21 souches positives), puis le tournesol (17 souches positives). L'utilisation couplée de ces 2 plantes-test permet une plus grande sécurité pour la détection des souches pathogènes.

Enfin notons qu'on peut trouver l'agent pathogène *Agrobacterium* (biovar₁ et biovar₂) et un *Agrobacterium* non pathogène au niveau de la même tumeur : par exemple les souches 121 (Tableaux II, III, IV). Ceci montre la variabilité des souches au niveau du même site d'infection comme précédemment observé par Anderson & Moore (1979) et Nesme *et al.* (1987).

Les agents pathogènes *Agrobacterium* sont des souches à Nopaline et sont donc sensibles à la K 84. Ceci nous permet d'envisager éventuellement la lutte biologique dans notre pays.

Dans des travaux futurs, l'accent sera mis sur l'étude sérologique des souches d'*Agrobacterium* en vue de leur détection en pépinière au Maroc, sur l'étude de la sensibilité variétale des différentes espèces fruitières vis-à-vis de l'agent pathogène et sur l'évaluation des possibilités de la lutte biologique et chimique.

RÉFÉRENCES

Allen N. & Holding A.J. (1974) Genus II. *Agrobacterium* Conn. 1942. In : *Bergey's manual of determinati-*

ve bacteriology, 8^e Edition. (R.E. Buchanan & N.E. Gibbons eds) Williams & Wilkins, Baltimore, 246-267

Anderson A.R. & Moore L.W. (1979) Host specificity in the genus *Agrobacterium*. *Phytopathology* 69, 320-323

Ark A. & Schroth M.N. (1958) Use of slices of carrot and other fleshy roots to detect crown-gall in soil. *Plant Dis. Rep.* 42, 1 279-1 281

Ayers S.H., Rupp P. & Johnson W.T. (1919) Study on the alkali forming bacteria in milk. U.S. Depart. *Agr. Bull.* 782 P

Bazzi L. & Rosciglione B. (1982) *Agrobacterium tumefaciens* biotype₃, causal agent of crown-gall on Chrysanthemum in Italy. *Phytopathol. Z.* 103, 280-284

Benjama A., Soussi M. & Benyouness C. (1987) Studies on the crown-gall bacterium in Morocco. *Arab and Near East Plant Prot. Newsl.* 4, 16

Bernaerts M.J. & De Ley J. (1963) A biochemical test for crown-gall bacteria. *Nature*, 197, 406-407

Dhanvantari B.N. (1978) Characterization of *Agrobacterium* isolates from stone fruits in Ontario. *Can. J. Bot.* 56, 2 309-2 311

Holmes B. & Roberts P. (1981) The classification, identification and nomenclature of *Agrobacteria* incorporating revised descriptions for each of *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn. 1942, *Agrobacterium rhizogenes* (Riker *et al.*) Conn. 1942 and *Agrobacterium rubi* (Hildebrandt) Starr and Weiss 1943. *J. Appl. Bacteriol.* 50, 433-468

Keane P.J. Kerr A. & New P.B. (1970) Crown-gall of stone fruit II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Aust. J. Biol. Sci.* 23, 585-595

Kerr A. (1974) Soil microbiological studies on *Agrobacterium radiobacter* and biological control of crown-gall. *Soil Sci.* 118-168

- Kerr A. & Brisbane P.G. (1983) *Agrobacterium*. In : *Plant bacterial Diseases : a diagnostic guide* (Fahy & Persley, eds) Academic press, 27-43
- Kerr A. & Panagopoulos C.G. (1977) Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. *Phytopathol. Z.* 90, 197-199
- Kerr A., Young J.M. & Panagopoulos C.G. (1978) A proposed nomenclature for plant pathogenic bacteria Genus II. *Agrobacterium* Conn. 1942. *N. Z. J. Agr. Res.*, 21, 153-177
- Kerstens K. & De Ley J. (1984) Genus *Agrobacterium* Conn. 1942. In : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (N.R. Krieg and J.C. Holt eds) vol. 1, 244-254
- Kerstens K., De Ley J., Sneath P.H. & Sackin M. (1973) Numerical taxonomic analysis of *Agrobacterium*. *J. Gen. Microbiol.* 78, 227-239
- Knauf V.C., Panagopoulos C.G. & Nester E.M. (1982) Genetic factors controlling the host range of *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytopathology*, 72, 1 545-1 549
- Kovacs N. (1956) Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by oxidase reaction. *Nature* 178, 703
- Lopez M. (1978) Characteristics of French isolates of *Agrobacterium*. *Proc. 4 th. Int. Conf. Plant Pathogenic Bact.*, Angers 1, 233-238
- Miller H.J. & Vrugink J. (1981) An assessment of biochemical and serological tests for *Agrobacterium radiobacter* subsp. *tumefaciens*. *Phytopathol. Z.* 102-300
- Nesme X., Michel M.F. & Digat B. (1987) Population heterogeneity of *Agrobacterium tumefaciens* in galls of *Populus* L. from a single nursery. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 655-659
- New P.B. & Kerr A. (1972) A selective medium for *Agrobacterium radiobacter* biotype 2. *J. Appl. Bacteriol.* 34, 233-236
- Panagopoulos C.G. & Psallidas P.G. (1973) Characteristics of Greek isolates of *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend). *J. Appl. Bacteriol.* 30, 233-240
- Panagopoulos C.G., Psallidas P.G. & Alivizatos A.J. (1978) Studies on biotype 3 of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens*. *Proc. 4th. Int. Conf. Plant Pathogenic Bact.* Angers 1, 221-228
- Paulus F., Huss B., Bonnard G., Ridé M., Szegedi E., Tempé J., Petit A. & Otten L. (1989) Molecular systematics of Biotype III Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Plant Microb. Inter.* 2, 64-74
- Schaad V.M. (1980) Gram negative bacteria. In : *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Amer. Phytopat. Soc. St. Paul, Minnesota 17-25
- Simmons J.S. (1926) A culture medium for differentiating organisms of the typhoid-colon *Aerogenes* groups and for isolation of certain fungi. *J. Infect. Dis.* 39, 209-214
- Spiers A.G. (1979) Isolation and characterization of *Agrobacterium* species. *N. Z. J. Agric Res.* 22, 631-636
- White L.O. (1972) The taxonomy of the crown-gall organism *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to *Rhizobia* and other *Agrobacteria*. *J. Gen. Microbiol.* 72, 565-574