

# **CARACTERISATION EN BIOVARS D'ISOLATS MAROCAINS D'AGROBACTERIUM ISSUS DE TUMEURS RACINAIRES DES ROSACEES FRUITIERES**

A. BENJAMA 1 et S. DAOUD 2

## **RESUME**

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**

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

2 Faculté des Sciences, Meknès, Maroc

## 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**

## I- 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 & Holding (1974), mentionnent Agrobacterium tumefaciens 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), Knauf et al. (1982), Kersters & De Ley (1984) (Tableau 1). 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).

## **II- MATERIELS ET METHODES**

### **1. 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
Erythriol	-	+	-
Malonate	-	+	-
L+Tartrate	-	+	-

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

## 2. 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 biovar, d'*Agrobacterium* qui sont positives de celles du biovar 2 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 15 g par litre d'eau distillé) 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 10j.

### \* 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, saccha-

rose, 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.

### **3. Pouvoir pathogène sur plantes indicatrices**

Des tranches de carotte sont inoculées par dépôt d'une suspension dense ( $10^8$  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  $10^8$  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.

### **4. Inoculation de Kalanchoe en vue de l'analyse des opines**

Quelques souches d'*Agrobacterium* pathogènes du biovar 2 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	Maroc (Azrou)	1986	
		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			
	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

### III- RESULTATS

#### 1. 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 biovar 1, 26 souches (dont 14 pathogènes) en biovar 2 ; un biovar intermédiaire, répondant aux caractères des 2 biovars, a été appelé biovar 1-2 ; il comprend 3 souches non pathogènes.

#### 2. 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).

#### 3. 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.

### IV- DISCUSSION

La caractérisation physiologique des *Agrobacterium* montre que la population bactérienne marocaine est variée et hétérogène. le biovar 2 est dominant par rapport au biovar 1 comme c'est le cas en Australie (New & Kerr, 1972) ; en Grèce (Panagopoulos & Psallidas, 1973) ; aux Etats 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 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.

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

Biovar	N° de souche d'Agrobacterium	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 e	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*	+	+	+	+
<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 carotti.

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

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

\* - Test réalisé sur *Kalanchoa 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.

Enfin, notons qu'on peut trouver l'agent pathogène *Agrobacterium* (biovar 1 et biovar 2) 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.

## REFERENCES

- Allen N. & Holding A.J. (1974) Genus II. *Agrobacterium* Conn. 1942, In :  
Bergey's manual of determinative bacteriology, 8e 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* biotype 3, 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. & Robers 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* (Hildebrant) Star 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., 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) Identifications of *Pseudomonas pyocyanea* by oxidase reaction. *Nature* 178, 703
- Lopez M. (1978) Characteristics of French isolates of *Agrobacterium*. *Proc. 4th 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. & Alivizatos A. J. (1978) Studies on biotype 3 of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens*. *Proc 4th. Int. Conf. Plant Pathogenic Bact.* Angers 1, 221-228