

Simplification des tests biochimiques pour la caractérisation d'*Agrobacterium*, agents du Crown-gall des arbres fruitiers et du rosier

Benjama Ah¹., Redwane A¹., Nesme X.², El Gadda M.³, ElMedraoui L.³, Mourabit K³, Aaglane A.⁴, Al-Mai S.¹

¹ INRA- Laboratoire de Phytobactériologie de Marrakech, BP 533, Marrakech - Maroc

² Université Claude Bernard, Laboratoire d'écologie microbienne du sol, Lyon

³ Faculté des Sciences et techniques, Marrakech

⁴ Inspection de la Protection des Végétaux de Marrakech

Résumé

Les souches bactériennes d'Agrobacterium, agent du crown-gall, issues de tumeurs de rosacées fruitières et du rosier ont été isolées, en comparaison, avec des milieux spécifiques des biovars 1 et 2 classiques et du milieu Malonate/Glutamate additionné de téllurite. Les résultats obtenus s'avèrent intéressants pour ces milieux. Mieux encore, la préparation du MG+tellurite est plus facile et les colonies d'Agrobacterium sont reconnaissables à leurs caractères morphologiques de couleur noir. Il permet aussi l'isolement des Agrobacterium des deux biovars.

L'identification biochimique des Agrobacterium nécessite habituellement plusieurs tests. Le présent travail vise à simplifier le nombre des tests sans modifier la nomenclature de cet agent bactérien. Il a été réalisé dans le cadre du projet INCO-CG financé par l'union Européenne. Ce travail a été conduit sur une collection de 305 souches d'Agrobacterium isolées de différentes rosacées fruitières et rosier au Maroc en utilisant 3 tests (au lieu de 10) à savoir l'Uréase et aesculine, pour identifier les Agrobacterium, et le 3-Cétolactose pour distinguer les biovars 1 et 2. Les résultats confirment ceux de Mougel et al. (17) et Nesme (18) du Laboratoire d'écologie microbienne de l'Université Claude Bernard de Lyon.

Mots clés : *Agrobacterium*, isolement, test biochimique, milieu, biovar, microtitration, variable

Abstract : A simple and rapid biochemical tests using to characterize *Agrobacterium*, causing crown-gall of stone fruits and rose

The *Agrobacterium* strains, causing Crown gall on fruit trees and rose were isolated, in comparison, with specific medium for biovar 1 and biovar 2 of Brisbane and Kerr (5), and Malonate-glutamate medium adding potassium tellurite as antiseptic of Mougél et al (16). Isolating *Agrobacterium* is easier on Malonate/Glutamate/Tellurite medium because it is easy to prepare and the dark unit forming colonies are easily recognisable. The two mentioned biovars are growing in the same medium.

The biochemical characters to identify *Agrobacterium* need usually ten tests. This work was conducted in the frame of INCO-CG project to reduce the number of characters. Thus, *Agrobacterium* can be identified by using only three tests like Urease+ Esculine+ for the genus *Agrobacterium* and the 3- ketolactose for the biovar 1 (positive reaction) or biovar 2 (negative reaction). Our results show that, using usual characters gives 78% of variable reaction but the use of Urease/Esculine/and 3-ketolactose give 100% of stable reactions. With these three characters, the 305 strains of *Agrobacterium* isolated from fruit trees and rose in Morocco were identified for 49,9% as biovar 1 and 50,1% as biovar 2.

Key words : *Agrobacterium*, isolation, biochemical characters, medium, biovar, microtitration, variable

ملخص : تبسيط التحاليل البيوكيميائية لتشخيص *Agrobacterium* المسبب لغدة ياقة الأشجار المثمرة و شجرة الورد

بن جامع ع.1، رضوان أ.1، ناسم ك.2، الكدة م.3، مدرابي ل.3، مرابط خ.3، عكلان أ.4، المعى س.1

1 المعهد الوطني للبحث الزراعي، ص.ب. 533، مراكش، المغرب

2 جامعة كلود بيفنار، مختبر علم بيئة ميكروبات التربة، ليون، فرنسا

3 كلية العلوم التقنية، مراكش، المغرب

4 مفتشية حماية النباتات مراكش، المغرب

عزلت ارومات *Agrobacterium* المسبب لغدة ياقة من الورديات المثمرة و من أغراس الورد. استعمل لذلك الوسط الغذائي الخاص بالبيوفار 1 و 2 مقارنة مع الوسط الغذائي مالونات / كلوطاماط الذي أضيف إليه التيلوريت.

بينت نتائج هذه التجربة أهمية هاته الأوساط لعزل *Agrobacterium* كما أبانت على سهولة تحضير الوسط الغذائي مالونات / كلوطاماط + تيلوريت الذي يمكن من معرفة مستعمرات *Agrobacterium* بفضل صفاتهم المورفولوجي و الأسردة اللون.

يرتكز التشخيص البيوكيميائي لـ *Agrobacterium* عادة على عدة تحاليل، إلا أن هاته الدراسة تهدف للتقليل من عدد هذه التحاليل دون أن تمس بتسمية البكتيريا. وتجدر الإشارة إلى أن هذا البحث أنجز في إطار المشروع (إنكو) الممول من طرف (الإتحاد الأوروبي). شملت هذه الدراسة مجموعة تضم 305 أرومة من *Agrobacterium* التي عزلت من وريديات مثمرة وأغراس الورد المختلفة بالمغرب. تم تشخيص *Agrobacterium* اعتمادا على ثلاث تحاليل عوض العشرة الجاري بها العمل. هذه التحاليل الثلاث هي (أوريان) و (أسكولين) لتشخيص *Agrobacterium* و (3- سيطولكطوز) 1 و 2. تؤيد النتائج المحصل عليها من خلال هذه الدراسة تلك التي حصل عليها (موجيل وم. (17) و نسيم (18) في مختبر علم بيئة المكروبات بجامعة كلود برنار بليون.

الكلمات المفتاحية : *Agrobacterium*, عزل تحليل بيوكيميائي، أوساط غذائية، بيوفار، مكروترايون، متغير

Introduction

Le crown-gall est connu dans le monde entier et principalement dans le bassin méditerranéen. Il est provoqué par l' *Agrobacterium tumefaciens* vivant dans les sols et les rhizosphères des plantes. L'agent pathogène attaque une large gamme de plantes (7,14) en incorporant aux cellules végétales son plasmide pTi qui existe dans le génome de la bactérie (1,15,20,25,26). Son identification biochimique a connu une grande évolution (1,3,5,8,11,16,21). Cependant, les principaux tests usuels de caractérisation des biovars des *Agrobacterium* ne sont pas communs à tous les auteurs. Certains utilisent tous les caractères mentionnés par Keane *et al.* (10) et Panagopoulos *et al.* (19), en utilisant les milieux sélectifs (5,12) ou en utilisant les plaques de microtitration (6). D'autres réduisent ces tests en quelques caractères tel que l'easculine, l'uréase pour la caractérisation des *Agrobacterium* (17). Le 3-cetolactose est utilisé pour distinguer entre les biovars. Le but de ce travail, effectué dans le cadre du projet INCO-CG financé par l'Union Européenne, est de proposer un Schéma de caractérisation des *Agrobacterium* isolées au Maroc en réduisant le nombre de tests biochimiques d'identification.

Matériel et méthodes

Matériel bactérien

Les souches bactériennes utilisées (305 souches) dans cette étude sont isolées à partir des tumeurs développées sur le collet et les racines secondaires de quelques rosacées fruitières :

Amandier (*Prunus amygdalus*), prunier (*Prunus domestica*), pêcher (*Prunus persica*), abricotier (*Prunus armeniaca*) et du rosier (*Rosae* sp.). Les souches B6 et C58 (24) sont utilisées comme références (tableau 1).

Tableau 1. Origine et nombre de souches d'*Agrobacterium* testées

Plante hôte	Nombre de souches testées	biovar 1	biovar 2
Amandier (<i>Prunus amygdalus</i>)	56	30	26
Prunier (<i>Prunus domestica</i>)	118	63	55
Rosier (<i>Rosae</i> sp.)	66	50	16
Pêcher (<i>Prunus persica</i>)	59	6	53
Abricotier (<i>Prunus armeniaca</i>)	4	1	3
Pommier (<i>Prunus malus</i>)	B6*	B6	-
cerisier (<i>Prunus avium</i>)	C58*	C58	-

Milieux de culture d'isolement

Les milieux sélectifs de B1 et de B2 (12,22), comparés au milieu mannitol + glutamate (16) additionné de téllurite (17) pour l'isolement des *Agrobacterium* sont utilisés. Le milieu d'Ayers *et al.* (2) est utilisé comme support des tests biochimiques. Les tests Uréase et Easculine sont effectués pour l'identification des *Agrobacterium* ; et les milieux 3-cétolactose (4), Erythritol et L-tartrate pour la caractérisation des biovars.

Tests biochimiques préliminaires

Toutes les souches isolées ont subi d'abord les tests préliminaires tel que le Gram au KOH 0,3% (22), Hugh et leifson (9) et Oxydase (13). Seules les souches Gram- et HL oxydatif et inertes sont gardées. Ensuite ces souches ont subi les tests d'esculine en boîte, d'uréase et 3-cétolactose en plaque de microtitration (17). Les souches ayant répondu positivement sont utilisées pour le test du pouvoir pathogène.

Tests biochimiques secondaires

Une partie des souches identifiées (120) par les tests primaires ont subi les tests biochimiques secondaires pour l'identification des biovars (tableau 2) utilisant les sucres suivants : L+ tartrate, erythritol, mélézitose, acide succinique, malonate, saccharose et citrate de Simmons (23) en plaque de microtitration.

Tableau 2. Tests de caractérisation biochimique usuelle des biovars

Tests	Biovar 1	Biovar2
Uréase	+	+
Aesculine	+	+
3-Cetolactose	+	-
L+tartrate	-	+
Erythritol	-	+
Citrate de Simmons	-	+
Malonate	-	+
Saccharose	+	+
Mélézitose	+	-
Ac. succinique	-	+

Résultats et Discussion

L'isolement des *Agrobacterium* s'est beaucoup amélioré ces dernières années par l'utilisation de milieux simples et sélectifs tel que le milieu MG (Mannitol +Glutamate) de Moore *et al.*(16) amélioré par l'addition de tellurite à 80ppm de solution finale (Mougel *et al.*) (17), et qui permet de sélectionner les colonies noires d'*Agrobacterium*. Le rendement est meilleur que celui des milieux spécifiques de Keane *et al.* (10), Panagopoulos *et al.* (19), Brisbane and Kerr (5), Kerr and Panagopoulos (12).

L'utilisation des tests classiques d'identification des *Agrobacterium* tels que le métabolisme oxydatif des sucres sur le milieu de Hugh et Leifson (9), le Gram est intéressante pour sélectionner les souches bactériennes oxydatives et à Gram négatif. Mais ces tests sont dépassés par rapport à l'utilisation actuelle des plaques de microtitration (6,17) et qui ont donné satisfaction car économiques, faciles à préparer, à manipuler et à réactions instantanées sauf pour le 3-cetolactose qui demande 2 à 3 jours pour la révélation de la réaction. Cependant, le nombre de tests utilisés pour identifier les *Agrobacterium* reste élevé. La révélation de tous ces caractères en plaque de microtitration (tableau 2) sur les 305 souches d'*Agrobacterium* isolées au Maroc (Tableau 1) n'est pas nécessaire car si les réponses de l'uréase et l'aesculine sont tranchantes et répétitives (100%) pour l'identification d'*Agrobacterium* ; ce qui confirme les résultats de Mougel *et al.* (17); elles sont très variables (78,33%) pour les autres tests tels que le L+ tartrate, erythritol, mélézitose, acide succinique, malonate, saccharose et citrate (tableau 3). Ceci confirme le schéma suivi par l'équipe de Nesme (18) au Laboratoire d'écologie microbienne à l'université Claude Bernard de Lyon qui n'utilise que ces deux tests (Uréase/Ésculine) pour identifier les *Agrobacterium*.

L'identification des biovars peut se faire seulement avec le 3 ceto-lactose en plaque de microtitration (100% de réussite) (tableau 3) incubée pendant 3 jours à 28°C. On peut donc ne pas avoir recours à d' autres tests. Ces 3 tests (Uréase, Aesculine et 3-cetolactose), au lieu de

10, sont suffisants pour permettre d'identifier les souches d'*Agrobacterium* et leur biovar respectif.

Tableau 3. Résultats des tests biochimiques en plaque de microtitration

Plante hôte	Nbr de souches testés	Nbr de souches U+/E+*	Nbre de souches				
			3-cetolactose		selon les autres tests**		
			B1	B2	B1	B2	variable
Amandier	19	19	19	0	7	0	12
Prunier	50	50	45	5	9	1	40
Rosier	49	49	37	12	6	1	42
Pommier	B6	B6	B6	-	B6	-	-
Cerisier	C58	C58	C58	-	C58	-	-
-	K84	K84		K84	-	-	-
Total	120	120	102	18	24	2	94
		Pourcentage	100 %		21,67 %		78,33 %

*:U:test Urase - E : test Esculine

** : Citrate - acide succinique - Tratratre - Malonate - Mélézitose - Saccharose - Erythritol

Conclusion

Les tests biochimiques d'identification des *Agrobacterium* qui sont au nombre de 9 à 12 tests nécessitent des milieux spécifiques à préparation minutieuse et longue. Sur le plan pratique de routine, la réduction du nombre de test - sans pour autant changer la qualité des résultats - était nécessaire. La proposition actuelle d'utiliser le milieu MG (malonate+Glutamate additionné de tellurite à 80ppm) pour l'isolement des *Agrobacterium* et la simplification des tests biochimiques à 3 par l'utilisation de l'Uréase et esculine pour la caractérisation d' *Agrobacterium*, et l'utilisation du 3-cetolactose pour la caractérisation des biovars sont suffisants pour identifier les *Agrobacterium* isolés des plantes cultivées et des sols. Ensuite, ces souches peuvent subir d'autres tests tel que celui du pouvoir pathogène sur plantes indicatrices et la caractérisation de leur plasmide par PCR.

Remerciements

C'est grâce au soutien financier du projet INCO-CG n^o IC18-CT97-098, financé par l'Union européenne que nous avons pu réaliser ce travail. Nous remercions Mr. Nesme (Coordinateur du projet) pour ses conseils et son soutien. Nous remercions aussi le service de la protection des végétaux de Meknes, Azrou et Marrakech pour leur aide dans le travail de terrain.

Références bibliographiques

- 1- Anderson A.R. and Moore L.W. (1979). Host specificity in the genus *Agrobacterium*. *Phytopathology*, 69 : 320-323.
- 2- Ayers S. H., Rupp P. and Johnson W. T. (1919). Study on the alkali forming bacteria in milk. U. S. Department. Agr. Bull.: 782.
- 3- Benjama A. et Daoud S. (1989). Caractérisation en biovars d'isolats marocains d'*Agrobacterium* issues de tumeurs racinaires des rosacées fruitières. *Agronomie*, 9(9) : 897-90.
- 4- Bernaerts M.J. and Deley J. (1963). A biochemical test for crown-gall bacteria. *Nature*, 197: 406-407.
- 5- Brisbane P.G. and Kerr A. (1983). Selective media for three biovars of *Agrobacterium*. *J. appl. Bacteriol.*, 54 : 425-431
- 6- Cubero J. and Lopez M.M. (1999). A simple and rapid microtiter system to determine *Agrobacterium* biovar. Submitted in november 1999. (in Second Scientific report of INCO-CG project - Lyon 1999).
- 7- De Cleen M. and De Ley J. (1976). The host range of crown-gall. *Bot. Rev.*, 42: 389-466.
- 8- Holmes B. and Roberts P. (1981). The classification, identification and nomenclature of *Agrobacterium*. *J. applied Bacteriology*, 50 : 443-467.
- 9- Hugh R. and Leifson E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxydative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *J. Bact.*, 66: 24-26.
- 10- Keane P. J., Kerr R. A. and New P. B. (1970). Crown-gall of stone fruit. II- Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Aust. J. Biol. Sci.*, 23: 585-595.
- 11- Kesters K., De Ley J., Sneath P.H.A., Sackin M. (1973). Numerical taxonomic analysis of *Agrobacterium* isolates. *J. Gen. Microbiol.*, 78 : 227-239.
- 12- Kerr A. and Panagopoulos C. G. (1977). Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. *Phytopathology Z.*, 90: 172-179.1
- 13- Kovacs N. (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanae* by the oxidase reaction. *Nature*, 178: 703.
- 14- Moore L.W. and Warren G. (1979). *Agrobacterium radiobacter* strain 84 and biological control of crown-gall. *Ann. Rev. Phytopathol.* 17: 193-179.
- 15- Moore L.W. and Cooksey D.A. (1981). Biology of *Agrobacterium tumefaciens* : Plant interaction. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 13: 15-46.
- 16- Moore L.W., Kado C.I. and Bouzar H. (1988). *Agrobacterium*, in Laboratory guide identification of Plant Pathogenic Bacteria (Schaad N.W., ed.). APS Press, St Paul, MN, pp. 16-36.
- 17- Mougél C., Cournoyer B., Nesme X. (1998). A semi-selective Medium for quantitative and qualitative study of *Agrobacterium* population from soil, using tellurite resistance and specific probes. (submitted for Phytopathology) - in First Scientific report of INCO-CG project - Lyon 1998).
- 18- Nesme X. (1998). First Scientific report of INCO-CG Project, financed by the European Union.
- 19- Panagopoulos C. G., Psallidas P. G. and Ali Vizatos A. J. (1978). Studies on biotype 3 of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens*. *Proc 4th Intern. Conf. Plant patho. Bact.*, Angers (France), 1: 221-228.
- 20- Paulus F., Huss B., Bonnard G., Ridé M., Szegedi E., Tempé J., Petit A. and Otten L. (1989). Molecular systematic of biotype 111 Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Plant Microbe-interactions* 2: 64-74.

- 21- Speirs A. G. (1979). Isolation and characterization for *Agrobacterium* species. N. Z. J. Agri. Res., 22 : 631-635.
- 22- Schroth M. N. and Moller W. J. (1976). Crown-gall controlled in the field with a non pathogenic bacteria. Plant Dis. Repr., 60: 275-277.
- 23- Simmons J. S. (1926). A culture medium for differentiating organisms of the hyphoid colon. Acrogens groups and for Isolation of certain fungi. J. Infect. Dis. 39: 209. (In KEANE *et al.*, 1970).
- 24- Sonokis S. and Kado C. I. (1978). Proteins conferred by the virulence specifying plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* C-58. Proc. NaU. Acad. Sci. USA, 75: 3796-3800.
- 25- Van Larebeken, Engler G., Holsters M., Van Den Elsacker S., Zarnen L., Schilproort R.A. and Schell J. (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown-gall inducing ability. Nature, London 252 : 169-170.
- 26- Winnans SC. (1992). Two-way chemical signaling in *Agrobacterium* -plant interaction. Microbiol rev. 56 : 12-31.