

Influence de la température et du temps d'incubation *in vitro*, sur l'antagonisme de l'*Agrobacterium radiobacter* (souche K₈₄) contre l'*Agrobacterium*, agent causal de la galle du collet des rosacées fruitières

Benjama¹ Ah., Cherif² M.A., Redwane³ A.

¹Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire de Phytobactériologie, BP. 533-Marrakech

²Ministère de l'agriculture, Nouakchot, Mauritanie

³Faculté des Sciences Ain-Chock, Casablanca

Résumé

Trente et une souches d'*Agrobacterium* sp., dont 13 du biovar 1 et 22 du biovar 2, ont été testées *in vitro* pour leur sensibilité à la bacteriocine produite par la souche non pathogène du biovar 2, l'*Agrobacterium radiobacter* var. *radiobacter*, souche 84 de Kerr. Le test de sensibilité est réalisé à 3 températures : 20°C, 26°C et 30°C, et 3 temps : 24 heures, 48 heures et 72 heures d'incubation de la souche K₈₄. Les souches du biovar 1 (90%) se sont montrées plus sensibles que celles du biovar 2 (45%) à la K₈₄. Le plus grand nombre de souches sensibles est obtenu à 26°C après 48 heures ou 72 heures d'incubation de la souches 84 de Kerr. Les conclusions sur 24 heures ne sont pas fiables. Ce résultat est très important à prendre en considération pour décider de la lutte biologique en plein champs.

Mots clés. *Agrobacterium*, biovar, K₈₄, inhibition, antagonist, température, temps

Abstract : Influence of the temperature and time of incubation *in vitro* of antagonist *Agrobacterium radiobacter* (strain K₈₄) in controlling crown-gall of fruit trees caused by *Agrobacterium* sp.

Thirteen strains of biovar 1 and 22 of biovar 2 of *Agrobacterium* were tested for their sensitivity to bacteriocin produced by *Agrobacterium radiobacter* biovar 2 Kerr's strain 84 *in vitro*. Incubation of non pathogenic strain K₈₄ in this test was done at three temperature 20°C, 26°C, 30°C, and three periods 24, 48, 72 hours. Biovar 1 strains were more sensitive than biovar 2 strains. Ninety's per cent of biovar 1 strains were sensitive but only 45% of biovar 2 strains were sensitive to K₈₄ strain. The sensitivity to K₈₄ was greater when the incubation

of strain K_{84} was carried out at 26°C for 48h or 78 h. but less sensitivity with 24 h. incubation. The time incubation is a start point to decide the opportunity of biological control in the field.

Key words : *Agrobacterium*, biovar, K_{84} , inhibition, antagonism, temperature, time

ملخص : تأثير الحرارة و مدة الحضانة في البيئة المصطنعة على مضادة أكروبيكتيريوم غاديو باكتير (أرومة K84) إزاء أكروبيكتيريوم المسبب لغدة ياقة الورديات المثمرة.

بنجامع ع.1، الشريف م.2، رضوان ا.3

1 المعهد الوطني للبحث الزراعي-مختبر فيتوبكتريولوجيا ص ب 533 مراكش.

2 وزارة الفلاحة نواكشوط موريطانيا

3 كلية العلوم عين الشق الدار البيضاء

يشمل هذا البحث دراسة حساسية 31 أرومة من أكروبيكتيريوم (13 منها تنتمي لبيوفار 1 و 22 أخريات لبيوفار 2) للمادة التي يفرزها أكروبيكتيريوم غاديو باكتير K84 (النوع غير المرضي). لتحديد هذه الحساسية جريت ثلاث درجات للحرارة (20°C , 26°C , 30°C) وثلاث توقيتات 24h، 48h و 72h لحضانة K84.

بينت نتائج هذا البحث أن الارومات المنتمية لبيوفار 1 لها حساسية أكثر من أرومة كروبيكتيريوم المنتمية لبيوفار 2 (90% و 45% على التوالي).

كما أسفرت هذه الدراسة على أن الحرارة الملائمة للحصول على أكبر عدد من اكروبيكتيريوم الحساس هي 26°C و مدة الحضانة هي 48h أو 72h، أما نتائج 24h فليست قارة.

تشكل إذن النتائج المحصل عليها من خلال هذا البحث نقطة مهمة للشروع في عملية المقاومة البيولوجية في الحقل.

كلمات مفتاحية : أكروبيكتيريوم ، بيوفار ، K84 ، كبح ، مضادة حرارة، توقيت

Introduction

La galle du collet ou "Crown-gall" est une maladie bactérienne qui affecte de nombreuses espèces végétales. L'agent causal est une bactérie nommée *Agrobacterium radiobacter* var. *t-*

mefaciens (9). Actuellement, la plupart des auteurs considèrent que le genre *Agrobacterium* ne renferme qu'une seule espèce subdivisée en deux variétés : *A. radiobacter* var. *tumefaciens* (variété pathogène) et *A. radiobacter* var. *radiobacter* (variété non pathogène). La variété *tumefaciens* pathogène diffère de la variété *radiobacter* non pathogène par la présence dans sa cellule d'un plasmide Ti (tumor inducing). Ce plasmide est formé d'ADN qui est le support d'un certain nombre de caractères dont le pouvoir d'induction des tumeurs (13, 14).

Jusqu'à ces dernières années, malgré de nombreuses recherches, aucune méthode de lutte contre le "crown-gall" ne permettait d'assurer une protection satisfaisante (3, 5). De nombreux espoirs sont nés lorsque New et Kerr (8), ont montré qu'un *A. radiobacter* var. *radiobacter* (4) non pathogène isolé du sol (souche 84) était capable d'empêcher la formation des tumeurs provoquées par le pathogène *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens*.

Des expérimentations en serre *in vivo* et au champ mise en place dans plusieurs pays comme l'Australie, la Nouvelle Zélande, l'Afrique du Sud, le Canada, les Etats-Unis, l'Angleterre, la France, la Grèce, la Hongrie et l'Italie, sont venues confirmer les travaux de Kerr concernant l'efficacité de la souche 84 dans la lutte contre le Crown-gall. Dans certains pays, le Crown-gall sur vigne et sur pêcher n'est pas contrôlé par la souche non pathogène K₈₄ (6). Il s'avère donc que la lutte biologique au champ doit être précédée par une étude *in vitro* afin de connaître les facteurs de réussite de l'antagoniste. Ensuite, cette lutte pourra être menée au champ moyennant des essais préliminaires tout en tenant compte des facteurs climatiques et édaphiques, des techniques d'inoculation de la plante hôte et de la souche pathogène existante dans le milieu naturel.

Le but de ce travail est de :

- déterminer l'influence de la températures et du temps à la production et l'expression de la bacteriocine 84 *in vitro*.
- déterminer la sensibilité des isolats locaux d'*Agrobacterium* à la bacteriocine 84 produite par *A. radiobacter* var. *radiobacter* (4) sur milieu gélosé,
- déterminer la sensibilité des biovars 1 et 2.

Matériels et méthodes

Souches bactériennes

Les souches bactériennes sont isolées à partir des tumeurs développées sur les racines secondaires de quelques rosacées fruitières : Amandier (*Prunus amygdalus*); Pêcher (*Prunus persica*) et Prunier (*Prunus domestica*) (tableau 1).

Trente cinq souches d'*Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* sont utilisées dans cet essai. L'identification des biovars et le pouvoir pathogène se font selon les caractères décrits dans Benjama et Daoud (2). La souche antagoniste utilisée tout au long de cette étude est la souche K₈₄ de Kerr (*A. radiobacter* var. *radiobacter*).

Tableau1. Origine des souche d'*Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* testées contre la K₈₄

| N°des souches | Plantes hôtes | Biovar | Lieu echantillonnage |
|---------------|-------------------------|--------|----------------------|
| 141.5 | <i>Prunus persica</i> | 1 | Azrou |
| 141.9b2 | <i>Prunus persica</i> | 1 | Azrou |
| 121.2 | <i>Prunus persica</i> | 1 | Azrou |
| 208.4 | <i>Prunus persica</i> | 1 | D.Chlihat |
| 209.3 | <i>Prunus persica</i> | 1 | D.Chlihat |
| 211.6 | <i>Prunus persica</i> | 1 | D.Chlihat |
| 72.18 | <i>Prunus domestica</i> | 1 | Chlihat |
| 103.30 | <i>Prunus domestica</i> | 1 | Meknès |
| 103.36 | <i>Prunus domestica</i> | 1 | Meknès |
| 204.11 | <i>Prunus domestica</i> | 1 | Azrou |
| 121.68 | <i>Prunus amygdalus</i> | 1 | Azrou |
| AT68 | <i>Prunus avium</i> | 1 | Souche anglaise* |
| AT82-43 | -- | 1 | Souche française* |
| 102.8 | <i>Prunus domestica</i> | 2 | Meknès |
| 102.9 | <i>Prunus domestica</i> | 2 | Meknès |
| 103.16 | <i>Prunus domestica</i> | 2 | Meknès |
| 103.21 | <i>Prunus domestica</i> | 2 | Meknès |
| 204.8 | <i>Prunus domestica</i> | 2 | Azrou |
| 121.1 | <i>Prunus amygdalus</i> | 2 | Azrou |
| 121.85 | <i>Prunus amygdalus</i> | 2 | Azrou |
| 121.90 | <i>Prunus amygdalus</i> | 2 | Azrou |
| 214.2 | <i>Prunus amygdalus</i> | 2 | Azrou |
| 214.4 | <i>Prunus amygdalus</i> | 2 | Azrou |
| 214.5 | <i>Prunus amygdalus</i> | 2 | Azrou |
| 214.16 | <i>Prunus amygdalus</i> | 2 | Azrou |
| 142.7 | <i>Prunus persica</i> | 2 | Azrou |
| 142.8 | <i>Prunus persica</i> | 2 | Azrou |
| 141.11 | <i>Prunus persica</i> | 2 | Azrou |
| 141.12 | <i>Prunus persica</i> | 2 | Azrou |
| 201.5 | <i>Prunus persica</i> | 2 | Azrou |
| 201.12 | <i>Prunus persica</i> | 2 | Azrou |
| 203.27 | <i>Prunus persica</i> | 2 | Azrou |
| 208.3 | <i>Prunus persica</i> | 2 | D. Chlihat |
| 208.7 | <i>Prunus persica</i> | 2 | D. Chlihat |

*Collection de l'INRA-Angers-France

Milieu de culture de la souche K₈₄

Le milieu de culture utilisé pour ce test d'antagonisme est le Yeast Mannitol Agar (Y.M.A.) (10) qui permet la production et la diffusion de la bacteriocine produite par la souche K₈₄. Il a été préféré au milieu de stonier (12) pour la qualité visuelle de l'inhibition en boîte de pétri.

Technique d'antagonisme

Une goutte (0,1 ml) de la suspension bactérienne de K₈₄ (108 bactéries/ml d'EDS) est déposée au centre d'une boîte contenant le milieu YMA et laissée sécher stérilement. Les boîtes sont incubées à 3 températures (20°C, 26°C et 30°C) et à 3 temps (24h, 48h et 72h). Après ces temps d'incubation, la souche K₈₄ est soumise à du chloroforme pendant 30 minutes pour inhiber son activité. La culture de la souche K₈₄ est essuyée de la surface du milieu avec un coton stérile imbibé d'eau distillée stérile. Ensuite 3 ml de YMA stérile (à 8 g d'agar noble dans 1000 ml d'eau distillée stérile) contenant 1 ml de la souche pathogène concentrée à 10⁸ bactéries/ml est étalée à la surface de la boîte puis laissée sécher stérilement.

Les boîtes sont ensuite remises en incubation à 28°C pendant 3 jours à l'issue desquels on mesure le diamètre d'inhibition selon 4 degrés de sensibilité.

Notation du degré de sensibilité

On mesure le degré de sensibilité des souches correspond au diamètre d'inhibition de la souche en question selon l'échelle ci-après :

Les souches présentant un diamètre d'inhibition :

- ≥ 3 cm sont dites très sensibles
- 2 ≤ 3 moyennement sensibles
- 1 ≤ 2 peu sensibles
- 0 ≤ 1 très peu sensibles
- 0 non sensibles

Résultats

Facteurs influençant la sensibilité à la bacteriocine

La sensibilité des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* à la K₈₄ dépend notamment de la température et le temps d'incubation (tableau 2) et le biovar (tableau 3).

Tableau 2. Nombre des souches d'*Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* sensibles à la K_{84} en fonction de la température et du temps d'incubation.

| Température d'incubation | Temps d'incubation | | |
|--------------------------|--------------------|-----------|-----------|
| | 24 heures | 48 heures | 72 heures |
| 20°C | 0 | 5 | 4 |
| 26°C | 9 | 14 | 14 |
| 30°C | 7 | 9 | 9 |

Tableau 3. Pourcentage de souches d'*Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* sensibles à la K_{84} après 48 heures d'incubation.

| | Temps et températures d'incubation | | |
|---|------------------------------------|--------|--------|
| | 20°C | 26°C | 30°C |
| <i>Agrobacterium radiobacter</i> var. <i>tumefaciens</i> | | | |
| Biovar 1 | 38,46% | 69,23% | 30,76% |
| Biovar 2 | 0% | 22,72% | 22,72% |

Influence de la température

L'examen de la figure 1 et 2 permet de constater que la température de 26°C permet à la plupart des souches de manifester leur sensibilité à la K_{84} . Par contre à 20°C, cette sensibilité est très faible (tableau 2). Le biovar 1 est plus sensible à la K_{84} que le biovar 2 (tableau 3).

D'autres part, il ressort de ces figures 1 et 2, qu'à 20°C, qu'il n'est pas intéressant d'incuber la K_{84} quelque soit la durée du temps d'incubation.

Influence du temps d'incubation de la K_{84}

Les figures 1 et 2 montrent que le maximum de sensibilité est obtenu avec un temps d'incubation de 48 heures. Ils permettent la manifestation des sensibilités de la plupart des souches. Cependant, la combinaison 26°C et 48 heures est idéale pour avoir des résultats fiables.

Variation de la sensibilité des souches pathogènes à la K_{84} en fonction des biovars

Les figures 1 et 2 permettent de dégager les remarques suivantes :

- Les souches du biovar 1 sont plus sensibles à la K_{84} que celles du biovar 2, quelque soit la température d'incubation choisie.
- Les meilleurs résultats sont obtenus à 26°C aussi bien au sein du biovar 1 qu'au sein du biovar 2.
- Les souches du biovar 2 sont plus sensibles à la K_{84} à 30°C, qu'à 20°C. A cette température (20°C/48 h. et 72h.), seules quelques souches du biovar 1 sont sensibles.

L'analyse de ces résultats permet de comprendre l'importance de la température dans la réussite du test de sensibilité des souches pathogènes à la K_{84} produite *in vitro* par la souche d'*Agrobacterium radiobacter* var. *radiobacter* de Kerr (K_{84}).

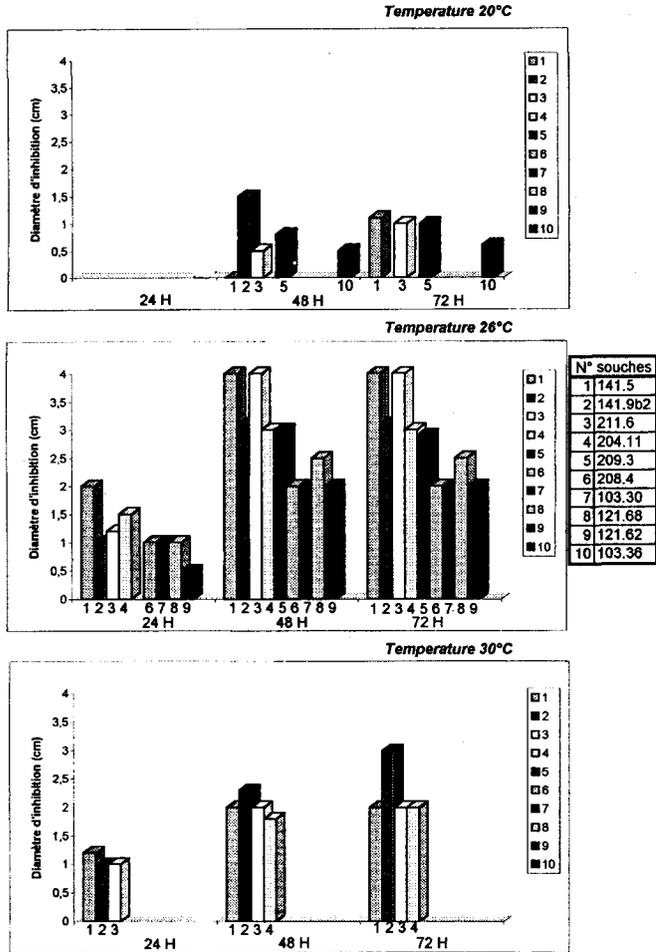


Figure 1. Variation du diamètre d'inhibition des souches d'*Agrobacterium* pathogènes du biovar 1 sous 3 périodes et 3 temps d'incubation de la K₃₄

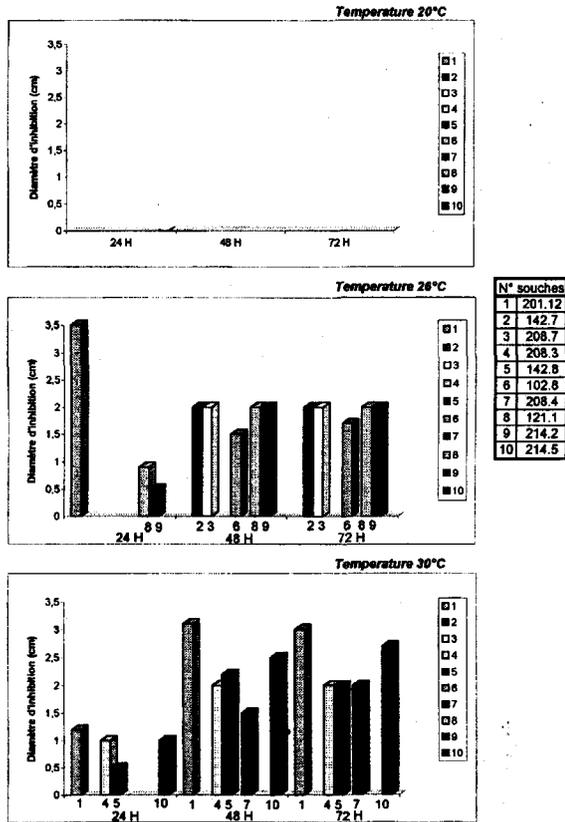


Figure 2. Variation du diamètre d'inhibition des souches d'*Agrobacterium* pathogènes de biovar 2 sous 3 périodes et 3 temps d'incubation de la K_{84}

Degré de sensibilité des souches pathogènes

On constate dans le tableau 2 et 3 que dans les mêmes conditions expérimentales, la réponse des souches pathogènes sensibles à la K_{84} peut varier d'une souche à l'autre.

Les souches d'*Agrobacterium* pathogènes testées pour leur sensibilité à la K_{84} sont classées selon leur degré de sensibilité dans le tableau 4. On constate que sur les 35 souches testées, 9 sont moyennement à très sensibles à la souche antagoniste, 11 souches sont très peu sensibles à peu sensibles alors que 15 souches ne sont pas sensibles.

Tableau 4. Degré de sensibilité des souches pathogènes d'*Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens*

| Classe | Souches pathogènes | | |
|-----------------------|--------------------|----------|-------|
| | Biovar 1 | Biovar 2 | Total |
| Très sensible | 5 | 1 | 6 |
| Moyennement sensibles | 1 | 2 | 3 |
| Peu sensibles | 3 | 6 | 9 |
| Très peu sensibles | 2 | 0 | 2 |
| Non sensibles | 3 | 12 | 15 |

Discussion

Pour le test de sensibilité à la K_{84} de 35 souches d'*Agrobacterium* pathogènes, 3 paramètres ont été pris en considération : le temps d'incubation, la température et le biovar. Le choix du milieu de culture a été fait sur la base des travaux de Speirs (10).

Le nombre de souches pathogènes sensibles obtenu à 20°C est nettement inférieur à celui obtenu à 26°C ou à 30°C. Ce qui veut dire que la K_{84} n'est pas efficace 20 °C. Le plus grand nombre de souches sensibles à la K_{84} est obtenu à 26°C, après 48 heures ou 72 heures d'incubation. Beaulieu et al. (1) trouvent des résultats semblables à 27°C après 2 ou 3 jours d'incubation de la K_{84} . Cette température permettrait donc une meilleure production et la diffusion de l'agrocine par la K_{84} et donc une meilleure caractérisation du pouvoir antagoniste de la souche *Agrobacterium radiobacter* var. *radiobacter* d'une part et une meilleure caractérisation de la sensibilité de la population d'*Agrobacterium* à tester.

La température d'incubation de la K_{84} a aussi un effet sur le degré de sensibilité des souches pathogènes. On remarque que le degré de sensibilité d'une souche sensible à l'agrocine varie d'une température à l'autre. La production de la bactériocine est meilleure à 26°C. Cette production est faible à 20 °C et est probablement affectée à des températures élevées comme 30°C.

Le troisième paramètre est le temps d'incubation de la K_{84} . Le meilleur temps d'incubation est de 48 heures et donc il faut en tenir compte dans une lutte biologique appropriée. La plupart des auteurs ont obtenu les mêmes résultats en incubant la souche antagoniste pendant au moins 48H. (1, 7, 10). Il est indispensable de connaître la sensibilité de la population indigène à la k_{84} *in vitro* pour pouvoir décider de son utilisation au champs. Le test *in vitro* n'est qu'un outil d'information sur les boivars existant dans le sols et leur degré de sensibilité. Les résultats sont meilleurs et le pourcentage de réponses des souches est plus élevé à 48 ou 72 heures qu'à 24 heures.

Le dernier paramètre considéré est celui du biovar. Le tableau 3 illustre bien l'influence du biovar sur la sensibilité des souches pathogènes à la K_{84} . Le biovar 1 s'avère plus sensible que le biovar 2 à la souche antagoniste. Ces résultats sont assez proches de ceux obtenus par Speirs (10) qui trouve 90% des souches du biovar 1 sensibles à l'agrocine produite par la souche antagoniste *in vitro*. Ce test d'antagonisme a montré une grande variabilité de la sensibilité des

souches du biovar 1. La même constatation a été faite par Schroth et Moller (11) entre le biovar 1 et 2.

Conclusion

Ce travail a permis de tirer plusieurs enseignements dans l'utilisation de la K_{84} . Chaque laboratoire doit tenir compte de ces facteurs (température, temps d'incubation et biovar) pour conclure sur la sensibilité de la population des *Agrobacterium* étudiés. La meilleure combinaison du test de sensibilité des souches d'*Agrobacterium in vitro* est 26°C/48 heures pour le biovar 1 et 2, et 30°C/48 ou 72 heures pour le biovar 2.

Le test de sensibilité à la K_{84} de quelques souches pathogènes d'*Agrobacterium* du biovar 1 et du biovar 2 effectué au cours de ce travail a montré que la plupart (57%) des *Agrobacterium tumefaciens* sont sensibles à la souche antagoniste isolée par Kerr en 1972. Ce qui laisse penser à la possibilité de l'utilisation de la souche antagoniste K_{84} pour la lutte biologique contre le Crown-gall au champ. Cependant ce traitement doit tenir compte des facteurs influençant la sensibilité des souches pathogènes à savoir, la température, le biovar et la variabilité de la souche antagoniste une fois au champ.

D'après ce travail, le traitement du Crown-gall serait intéressant à réaliser à deux périodes correspondant à 26°C et 30°C respectivement contre le biovar 1 et 2. Donc on peut avancer que les périodes printanière et pré-estivale (mars-avril) seraient les meilleurs moments pour une lutte biologique au champ.

Remerciements

Nous remercions vivement la Commission Européenne qui grâce au projet INCO-CG n° ERBIC18CT970198, on a pu compléter et finaliser ce travail. Nos remerciements à la Direction de l'INRA qui a contribué à l'aboutissement de ce projet. Nous remercions aussi Mr. Nesme, " Project leader " et ses collaborateurs, pour leur disponibilité et leurs conseils précieux.

Nos remerciements vont aussi au Service de la Protection des végétaux de Meknes pour leur contribution dans la recherche des échantillons.

Références bibliographiques

- 1- Beaulieu C., Coulombe J., Granger R.L., Miki B., Beauchamp C., Rossignol G. and Dion P. (1983). Characterization of opine-utilising bacteria isolated from Quebec, *Phytoprotection* 64 : 61-68.
- 2- Benjama Ah. et Daoud A. (1989). Caractérisations en biovars d'isolats marocains d'*Agrobacterium* issues de tumeurs racinaires des rosacées fruitières, *Agronomie* 9 : 887-890.

- 3- Faivre-Amiot A., Roux , Faivre M.L. (1979). Essai de lutte biologique contre la galle du collet (Crown-gall) à l'aide d'une souche d'*Agrobacterium* non pathogène : *Agrobacterium radiobacter* var. *radiobacter* (souche 84 de Kerr). *Phytiatrie-Phytopharmacie*, 28: 203-214.
- 4- 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.
- 5- Kerr A. (1972). Biological control of Crown-gall seed inoculation. *J. Appl. Bacteriol.* 35 : 493-497.
- 6- Kerr A. (1980). Biological control of Crown-gall through production of agrocin 84. *Plant Dis. Reprt.* 64 : 24-30.
- 7- Lopez M. M., Gorris M.T., Salcedo C.I., Montojo A. M. and Miro M. (1989). Evidence of biological control of *Agrobacterium tumefaciens* strains sensitive and resistant to agrocin 84 by different *Agrobacterium radiobacter* strains on stone fruit trees. *Appl. Environm. Microbiol.* 55: 741-746.
- 8- New P. B. and Kerr A., A selective medium for *Agrobacterium radiobacter* biotype 2, *J appl Bacteriol* 34 (1972) 233-236.
- 9- Smith E.F., Townsend C.S. (1907). A plant tumor of bacterial origin. *Science* 25 : 672-673, In: BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology, 1974.
- 10- Speirs A.G. (1980). Biological control of *Agrobacterium* species *in vitro*. *N. Z. Agri. Res.* 23: 133-137.
- 11- Schroth M. N. and Moller W. J. (1976). Crown-gall controlled in the field with a non pathogenic bacteria. *Plant Dis. Reprt.* 60 : 275-277.
- 12- Stonier L. (1960). *Agrobacterium tumefaciens* production of an antibiotic substance. *J. Bact.* 79: 880-898.
- 13- Van Larebeke N., Engler G., Holsters M., Van den Elsacker S., Zaenen I, Schilperoort And Schell J. (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown-gall inducing ability. *Nature* 252: 169-170.
- 14- Zaenen I., Van Labereke N., Van Montagu M. and Schell J. (1974). Supercoiled Circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Molec. Biol.* 86: 109-127.