

## Dépistage de l'*Agrobacterium* des rosacées fruitières par chromatographie en phase gazeuse au Maroc : Avantages et inconvénients

Benjama A. H.

Laboratoire de Phytobactériologie, INRA B.P. 533, Marrakech

### Résumé

*L'identification de l'Agrobacterium peut se faire soit par les méthodes classiques à savoir les caractères biochimiques, sérologiques et le test du pouvoir pathogène sur plantes indicatrices. L'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse est une méthode récente qui date des années 1990. Elle a été utilisée au Maroc pour la caractérisation des Agrobacterium isolés à partir des sols, tumeurs et plantes de pépinières sans symptômes. Une collection a donc été réalisée en utilisant des milieux spécifiques englobant 35 souches de la collection du laboratoire de phytobactériologie, 7 souches de référence isolées d'Allemagne, France et Grèce, 19 souches récentes isolées de tumeurs de pommier et pêcher, et 23 souches isolées de plants de pépinières sans symptômes à partir du pommier, pêcher, prunier, abricotier, amandier et rosier, et à partir des sols d'amandier et abricotier. Le chromatographe, acquis dans le cadre de la GTZ, est programmé et étalonné pour identifier les Agrobacterium suivant des profils étalons du biovar 1, 2 et 3.*

*La méthode permet d'identifier 82 échantillons à la fois en une nuit. Elle a permis d'identifier les Agrobacterium de collection de référence et ceux isolés à partir des plants sans symptômes. C'est une technique fiable et répétitive. Cependant, elle ne permet pas de distinguer les Agrobacterium pathogènes de ceux non pathogènes. Le passage par les inoculations de plantes indicatrices est obligatoire.*

*Cette technique est très valable dans un programme d'amélioration variétale pour le dépistage des Agrobacterium. D'autres techniques d'accompagnement tel que le dépistage par les techniques de biologie moléculaire à savoir l'identification des pTi des Agrobacterium pourrait être complémentaire.*

*Ce travail retrace l'itinéraire technique et la méthodologie à suivre pour l'identification des Agrobacterium.*

**Mots clés :** *Agrobacterium*, isolement, chromatographie, profil, acides gras, biovar

## Abstract : Detection of Rosaceae *Agrobacterium* by Gas chromatography in Morocco : advantages and disadvantages

*Agrobacterium* may be identified using classic methods such as biochemical or serological characters, and by pathogenic power of indicative plants.

Gas chromatography was used to characterize *Agrobacterium* isolated from soil, tumours or tree nurseries without symptoms. Use of specific culture mediums has permitted to realize a collection covering 35 strains of bacteriology lab collection, 7 strains isolated from Germany, France and Greece, 19 recent strains isolated from apple, peach, plum, apricot, almond and rose trees and from almond and apricot tree soils. The chromatograph acquired by GTZ, is programmed and calibrated to identify *Agrobacterium* according to standard profiles of "bio-var" 1, 2 and 3.

This technic is applied in plant breeding programme to detect the *Agrobacterium*. However, it does not distinguish pathogenic from non pathogenic *Agrobacterium*. Thus, inoculations of indicative plants are necessary. Other complementary technics such as molecular biology may be used.

**Key words :** *Agrobacterium*, isolation, gas chromatography, profil, biovar.

### ملخص : كشف مرض سرطان الأشجار المثمرة باستعمال طريقة التحليل الكروماتوغرافي (الطور الغازي) بالمغرب : المزايا والمساوىء

د. بن جامع ع.

مختبر علوم البكتيريولوجيا، المعهد الوطني للبحث الزراعي، ص.ب 533، مراكش، المغرب

يمكن تشخيص مرض الأشجار المثمرة (*Agrobacterium*) إما بالطرق الكلاسيكية وذلك باستعمال الخاصيات البيوكيماوية و المصلية و اختبار القدرة المرضية في النباتات المخبرة و إما باستعمال طريقة التحليل الكروماتوغرافي الغازي.

و تعد هذه الأخيرة نمطا جديدا بدأ التشخيص بها في التسعينات ، و عمل به في المغرب للكشف عن عزلات (*Agrobacterium*) المستخلصة من التربة و من الاورام و من نباتات المشتل التي لا تظهر الأعراض ( اودن اعراض ظاهرية) .وقد تم في هذه الدراسة، تكوين مجموعة العزلات باستعمال أوساط خاصة تضم 35 وحدة من المجموعة المتواجدة في مختبر علوم الجراثيم و 7 عزلات مرجعية من أصل ألماني . و فرنسي و يوناني . و تضم أيضا 19 عزلات حديثة استخلصت من اورام في التفاح و الخوخ و البرقوق و المشمش واللوز و الورد (الجل) و من تربة ضيعات اللوز و المشمش.

وتتم برمجة الآلة الكروماتوغرافية المستخلصة على أساس ان تشخيص سلالات (biovar) 1 و 2 و 3 من مرض *Agrobacterium*. كما يمكن لهذه الآلة تحليل 68 عينة في نفس الوقت و في ظرف ليلة واحدة. و قد مكنتنا هذه الطريقة المجدية و الفعالة من تشخيص العزلات المرجعية للمرض و كذا التي تم عزلها من الاشجار بدون اعراض ظاهرية ، غير أنها لاتميز بين *Agrobacterium* المرض (pathogène) والغير المرض (non pathogène).

لذلك فإن اللجوء الى النباتات المخبرة لإنتاج الأعراس ضروري جدا. و تبقى هذه التقنية، رغم هذا ، مهمة جدا في مجال برامج التحسين الوراثي قصد إبعاد كل ما هو غير سليم. و يمكن الإستعانة بتقنيات مدعمة لنتائج التشخيص كتقنية البيولوجيا الجزيئية التي تهتم بالبلاسميد *pti* للباكتيريا الممرضة. يسطر هذا العمل المقدم مسارا تقنيا و عمليا من أجل تشخيص الاكروباكتيريوم (*Agrobacterium*).

**الكلمات المفتاحية :** *Agrobacterium*، تشخيص، كروماتوغراف، نموذج، *biovar*، تحليل

## Introduction

L'agent pathogène du crown-gall, *Agrobacterium tumefaciens*, est un agent habitant le sol. Il induit des tumeurs sur les racines et collets des espèces dicotylédones. L'habileté à induire la tumeur réside dans le large plasmide appelé Tumor-inducing (Ti) (Watson et al., 1975) à partir duquel une partie est transférée au génome des cellules végétales infectées (Chilton et al., 1977).

L'identification de l'agent est basée surtout sur les tests biochimiques qui divisent l'*Agrobacterium* en trois biovars : biovar 1 et 2 inféodés aux rosacées fruitières (Krieg & Holt, 1984 ; Bien et al., 1990), et le biovar 3 inféodé exclusivement à la vigne (Loubser, 1978 ; Sûle, 1978 ; Burr & Katz, 1983). Seuls les biovars 1 et 2 possèdent les 2 formes pathogène et non pathogène. Le biovar 3 est peuplé exclusivement d'agents pathogènes spécifiques à la vigne. Le test du pouvoir pathogène reste le seul recours pour distinguer l'*Agrobacterium* pathogène.

Les milieux sélectifs ont été aussi développés pour isoler spécifiquement chaque biovar (Brisbane & Kerr, 1983). Ils sont très utiles, d'autant plus qu'on a affaire à un agent qui vit parmi toute une flore du sol.

Au Maroc, cette maladie est très connue chez les arboriculteurs et principalement les pépiniéristes. L'agent a été isolé et identifié de différentes espèces fruitières (Benjama et Schluter, 1978) (Benjama, Daoud 1989). Seule la technique de contrôle visuel à l'arrachage des plants est actuellement de rigueur par les services de la protection des végétaux. Un travail sur la recherche de sérums spécifiques de l'agent pathogène réalisé au niveau de notre laboratoire dans la perspective d'un programme de dépistage de l'*Agrobacterium* n'a pas donné les résultats souhaités (Benjama et al., 1996).

Dans cette même perspective, la GTZ (Convention GTZ n° 84.2070.5) nous a proposé d'essayer la chromatographie en phase gazeuse qui a donné d'excellents résultats sur vigne en Allemagne (Bien et al., 1990 ; Jäger et al., 1989a et b). Un programme sur 2 ans a été établi et réalisé au laboratoire à Marrakech (Benjama, 1992).

## Matériel et méthodes

### Matériel végétal et sol

Des plants âgés de 2 ans sont échantillonnés des pépinières de la région de Marrakech (tableau 1) qui serviront à la détection directe d'*Agrobacterium* (Pommier : *Malus pumila* - Poirier : *Pirus communis* - Rosier : *Rosa sp.* - Amandier : *Prunus amygdalus* - Prunier : *Prunus domestica* - Abricotier : *Prunus armeniaca* - Cognassier : *Cydonia vulgaris* ).

**Tableau 1.** Origine des échantillons et des espèces végétales

n° échantillon	zone d'échantillonnage	espèce végétale
463	Ghmat-Ouahi	<i>Malus pumila</i>
464	“ “	<i>Rosa sp.</i>
465	“ “	<i>Prunus armeniaca</i>
466	“ “	<i>Prunus amygdalus</i>
467	Ghmat-Idar	<i>Prunus persica</i>
468	“ “	<i>Cydonia vulgaris</i>
469	“ “	<i>Malus pumila</i>
470	“ “	<i>Prunus domestica</i>
471	“ “	<i>Prunus armeniaca</i>
472	“ “	<i>Pirus communis</i>
473	SODEA-Marr.	<i>Malus pumila</i>
474	“ “	<i>Prunus amygdalus</i>
475	“ “	<i>Prunus armeniaca</i>
476	Sol1 - SODEA	<i>Prunus amygdalus</i>
	Sol2 - Ghmat-Ouahi	<i>Prunus armeniaca</i>

### Matériel bactérien

Le matériel bactérien qui a servi à l'étude chromatographique est composé de souches d'*Agrobacterium* de référence ramené d'Allemagne par Mr. Jäger (tableau 2), de la collection marocaine (tableau 3) et de nouvelles souches bactériennes isolées à partir des tumeurs de pêcher et d'amandier issus de plantation de Chlihat et Azrou du moyen atlas (tableau 4) et à partir de plants sans symptômes de pépinières de la région de Marrakech (tableau 5).

**Tableau 2.** Souches de référence d'*Agrobacterium* (Jäger)

n° souche	origine	plante hôte	date
BV1	Allemagne	-	-
BV2	“ “	-	-
BV3	“ “	<i>Vitis vignifera</i>	-
A. rubi	“ “	<i>Rubus</i>	-

**Tableau 3.** Collection marocaine d'*Agrobacterium*

n° souche	origine	plante hôte	date
72.18	Chlihat	<i>Prunus domestica</i>	31/4/84
103.16	Ouadghiri	“ “	10/1/85
103.18	“ “	“ “	“ “
103.21	“ “	“ “	“ “
103.36	“ “	“ “	“ “
121.1	Meknès	<i>Prunus amygdalus</i>	1/1/86
121.10	“ “	“ “	“ “
121.20	“ “	“ “	“ “
121.27	“ “	“ “	“ “
121.87	“ “	“ “	“ “
121.90	“ “	“ “	“ “
134.10	Ouadghiri	<i>Prunus domestica</i>	11/11/86
135.5	“ “	“ “	“ “
136.4	“ “	“ “	“ “
141.1	Azrou	<i>Prunus persica</i>	5/1/87
141.2	“ “	“ “	“ “
141.5	“ “	“ “	“ “
141.9	“ “	“ “	“ “
141.10	“ “	“ “	“ “
141.12	“ “	“ “	“ “
141.13	“ “	“ “	“ “
142.5	“ “	“ “	“ “
142.7	“ “	“ “	“ “
193.16	Chlihat	“ “	23/6/88
193.67	“ “	“ “	“ “

201.12	Azrou	“ “	25/1/89
203.27	“ “	“ “	“ “
208.3	Chlihat	“ “	7/3/89
208.41	“ “	“ “	“ “
208.42	“ “	“ “	“ “
208.43	“ “	“ “	“ “
209.3	“ “	“ “	“ “
214.2	Azrou	<i>Prunus amygdalus</i>	7/3/89
214.4	“ “	“ “	“ “
214.16	“ “	“ “	“ “
At68	Grèce	“ “	1967
At 82/43	France	“ “	“ “
AgrRhi 24.9-91	CNPB-Angers	“ “	20/10/93

**Tableau 4.** Nouvelles souches d'*Agrobacterium* isolées des tumeurs

n° souche	origine	plante hôte	date
226.5	Azrou	<i>Prunus persica</i>	9/12/91
227.2	“ “	“ “	10/1/92
227.4	“ “	“ “	“ “
229.9	Chlihat	“ “	22/2/92
229.20	“ “	“ “	“ “
229.23	“ “	“ “	“ “
229.26	“ “	“ “	“ “
229.29	“ “	“ “	“ “
229.30	“ “	“ “	“ “
230.3	“ “	“ “	8/4/92
230.11	“ “	“ “	“ “
230.13	“ “	“ “	“ “
230.19	“ “	“ “	“ “
230.37	“ “	“ “	“ “
230.49	“ “	“ “	“ “
321.1	“ “	<i>Prunus amygdalus</i>	25/1/92
321.3	“ “	“ “	“ “
321.5	“ “	“ “	“ “
321.6	“ “	“ “	“ “

**Tableau 5.** Souches bactériennes isolées à partir de plants de pépinières

n° souche	origine	plante hôte	date
463.2	Ghmat-Ouahi, Marr.	<i>Malus pimula</i>	9/6/92
464.1	“ “	Rosa sp.	“ “
467.1	Ghmat-Idar, Marr.	<i>Prunus persica</i>	“ “
467.2	Ghmat-Ouahi, Marr.	<i>Prunus persica</i>	“ “
468	Ghmat-Idar, Marr.	<i>Cydonia vulgaris</i>	“ “
470.1	“ “	<i>Prunus domestica</i>	“ “
470.2	“ “	“ “	“ “
470.3	“ “	“ “	“ “
470.4	“ “	“ “	“ “
470.5	“ “	“ “	“ “
470.6	“ “	“ “	“ “
470.7	“ “	“ “	“ “
470.8	“ “	“ “	“ “
473.1	Sodea, Marr.	<i>Malus pimula</i>	“ “
474.1	“ “	<i>Prunus amygdalus</i>	“ “
474.2	“ “	“ “	“ “
474.3	“ “	“ “	“ “
475.1	“ “	<i>Prunus armeniaca</i>	“ “
475.2	“ “	“ “	“ “
476.1	“ “	Sol amandier	“ “
476.2	Ghmat-Ouahi	Sol abricotier	“ “
R10	Ghmat-Ouahi	Racines abric.	“ “
N90	-	-	-

### Milieux de culture utilisés

- **TSBA** : milieu composé de trypsine soja et agar à raison de 30 g/litre à pH 7, utilisé comme milieu usuel de culture bactérienne.

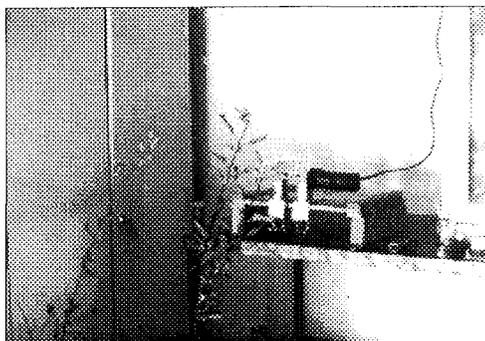
- **Milieux spécifiques** : Un milieu de base de Brisbane & Kerr (1983) additionné à froid d'un ml de sélénite de sodium (à 1 %) filtré, et d'un ml d'actidione (à 2 %) filtré, on ajoute soit le L-arabitol (3.04 g/l) et le cristal violet à 0.1 % (2 ml) pour sélectionner les *Agrobacterium* du biovar 1 (milieu violet) ; soit l'erythritol (3.05 g/l) et le vert de malachite à 0.1 % (5ml/l) pour sélectionner les *Agrobacterium* du biovar 2 (couleur verdâtre). Pour sélectionner le bio-

var 3, on ajoute du sodium tartrate (5.75g/l) et le rouge de congo à 1% (2.5ml/l) (couleur saumon).

## Méthodes de préparation des souches bactériennes pour l'extraction des acides gras

**A partir des souches bactériennes pures :** Elle sont mises en culture sur TSBA pendant 72 heures à  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . On récolte 100 mg de culture bactérienne par tube stérile (très propre et brillant) et on démarre la préparation des acides gras. Le prélèvement de la culture bactérienne doit être fait dans la partie inférieure de la culture car plus jeune et moins adhérente au milieu.

**A partir des plants :** On coupe le plant à sa base et on enlève toutes les protubérances de la tige. Ensuite, on le divise en partie apicale, médiane et basale au niveau du greffage. On les épluche à l'aide d'une meuse électrique (fig.1) (Jäger et al., 1989 b), qui permet d'avoir des tissus très fins et friables (sciures fraîches). Ces sciures sont directement récupérées dans un mortier flambé préalablement à l'alcool 95, et écrasées au pilon. On prélève 0.2 ml du jus qu'on étale sur les milieux violet (du biovar 1) et verdâtre (du biovar 2) pour les rosacées fruitières et saumon (du biovar 3) pour la vigne. Les boîtes sont incubées 72 heures à  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Les bactéries typiques d'*Agrobacterium* sont prélevées, purifiées et cultivées sur milieu TSBA pendant 72 heures à  $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ . ensuite on démarre la méthode d'extraction.



**Figure 1.** Epluchage de l'écorce du plant avec la meuse électrique + mortiers et pilons flambés à l'alcool

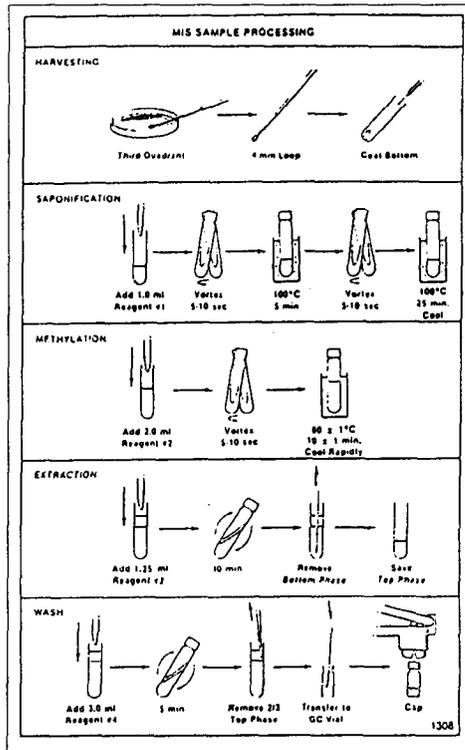
## Méthode d'extraction des acides gras

a) réactifs à préparer :

- Réactif 1 de saponification (45 g NaOH+ 150 ml methyl alcool)
- Réactif 2 de méthylation (325 ml Hcl 6N+275 methyl alcool)
- Réactif 3 de solvant (200 ml Hexane+200 ml Ether)

□ Réactif 4 de lavage (10.8 g NaOH+900 ml eau distillée)

b) étapes d'extraction : les étapes de l'extraction des acides gras sont décrites sur le schéma de Miller & Berger (1985) (fig.2).

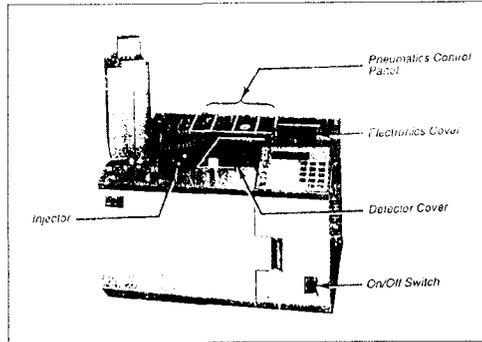


**Figure 2** Etapes d'extraction des acides gras

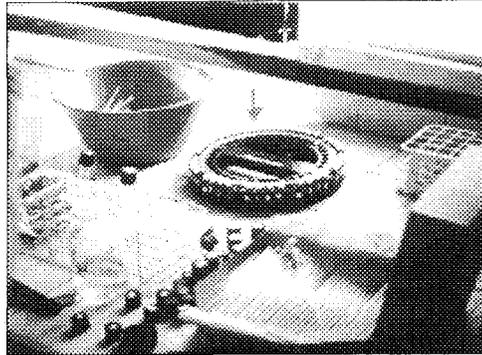
## Description de l'appareil de chromatographie utilisé

L'appareil est formé d'une pompe à air (2.1 bars, 30 psi), d'une bouteille à H<sub>2</sub> qualité supérieure (30 psi), de trois filtres (un à air et deux à gaz), d'un autosystem et auto-sampler, d'un intégrateur (computer) et d'une imprimante (fig.3). Une fois les échantillons à analyser sont prêts en flacons scellés, on les dispose sur la rampe ronde du chromatographe (fig.4). On reporte les données sur intégrateur et on met en marche l'auto-system, pendant la nuit. Ce chromatographe peut traiter 68 échantillons en une seule analyse en 24 heures.

Après, on analyse les profils d'acides gras sortis sur imprimante et on les compare avec des profils étalons (souches de référence du tableau 2) de biovars bactériens.



**Figure 3.** Description de l'appareil de chromatographie



**Figure 4 :** Rampe avec les 68 ampoules scellées contenant les extraits d'acides gras à analyser

### Paramètre de mise en marche de l'appareil

Il est évident que la mise en marche de la technique suit une procédure scrupuleusement préparée à l'avance telle que le nettoyage de la colonne au méthanol, la vérification des circuits de gaz et filtres, la vérification et la fixation des paramètres du système (Benjama, 1992):

- Carrier gas : H<sub>2</sub> ultrapure
- Pression de la colonne : 15 psi
- Split ratio : 1/25
- Split vent : 42-47 ml/sec.
- FID Hydrogen : 40-45 ml/min
- FID Air : 420-470 ml/sec.
- Température 1 : 170°C
  - Isotime 1 : 0 min
  - Rate 1 : 5°C/Sec.
- Température 2 : 230°C

Isotime 2 : 0 min

Rate 2 : 30°C/Sec.

Température 3 : 270°C

Isotime 33 : 2 min

Rate 3 : 0°C/Sec

Injecteur à 250°C

Détecteur à 300°C

## Résultats et discussion

### Analyse des chromatogrammes des souches d'*Agrobacterium* de référence

les profils standards d'acides gras des souches de référence (biovar 1, 2 et 3) du tableau 2 sont reportés sur les figures 5, 6 et 7. Les trois biovars possèdent des pics P1, P2 et P4 caractéristique du genre *Agrobacterium*. On peut différencier le biovar2 par la présence de plusieurs pics (quatre à cinq) qui apparaissent pendant les 2 à 3 premières minutes du temps de rétention entre les deux pics P1 et P2 qui apparaissent aux temps de rétention respectifs de 1.8 et 2.9 et la présence d'un pic P3, alors qu'ils sont absents pour le biovar 1 et 3.

Entre le biovar 1 et 3, la différenciation peut être faite d'abord par le pic 6 qui est plus représenté chez le biovar1 et le pic 5 qui est présent chez le biovar3 et absent chez le biovar 1.

Selon ces profils et par superposition avec les mêmes valeurs, on vérifie l'identité des souches pures de la collection du laboratoire du tableau 3, des souches isolées par les procédés usuels à partir des tumeurs du tableau 4 et les souches isolées directement des plants de pépinières sans symptômes sur milieux spécifiques du tableau 5.

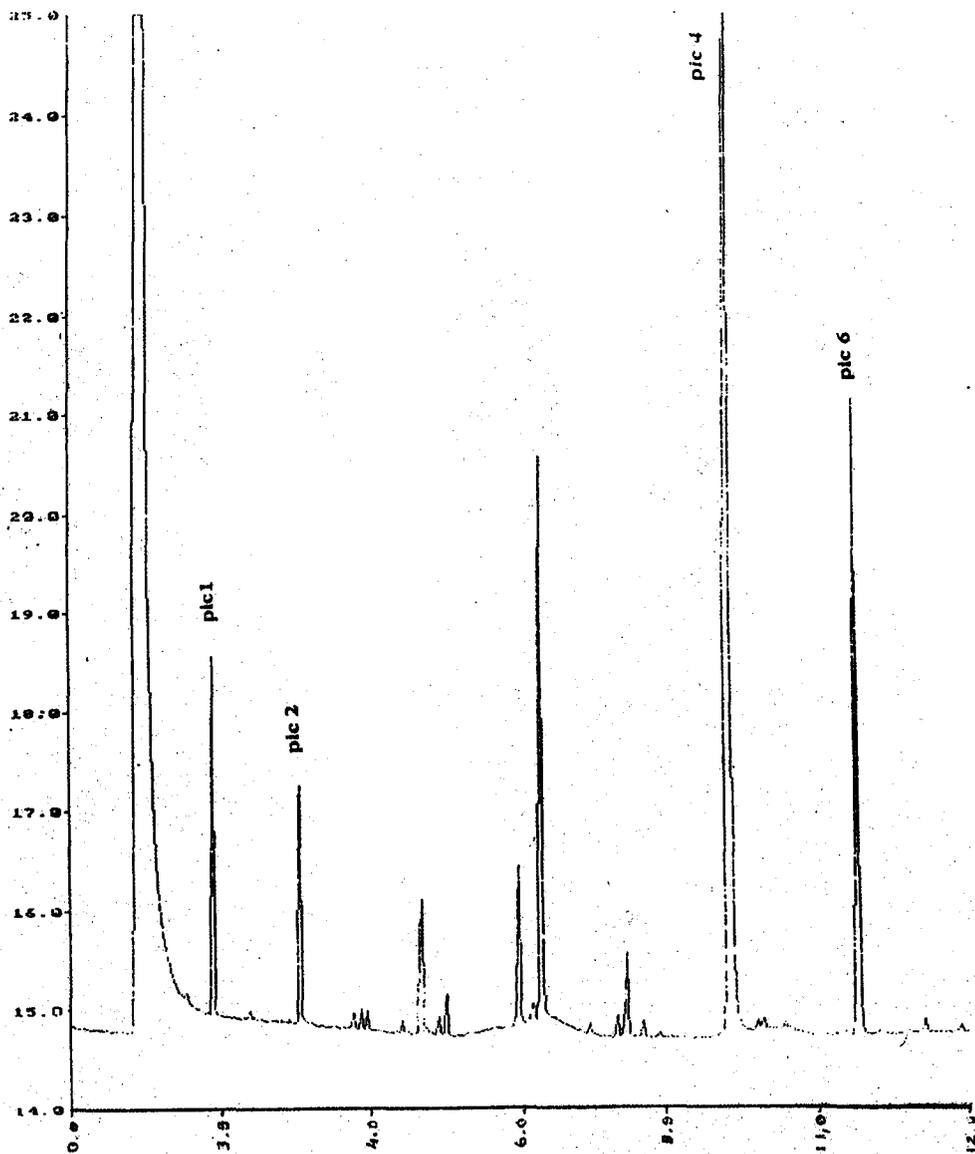


Figure 5. Profil chromatographique du biovar 1 avec les pics 1, 2, 4 et 6

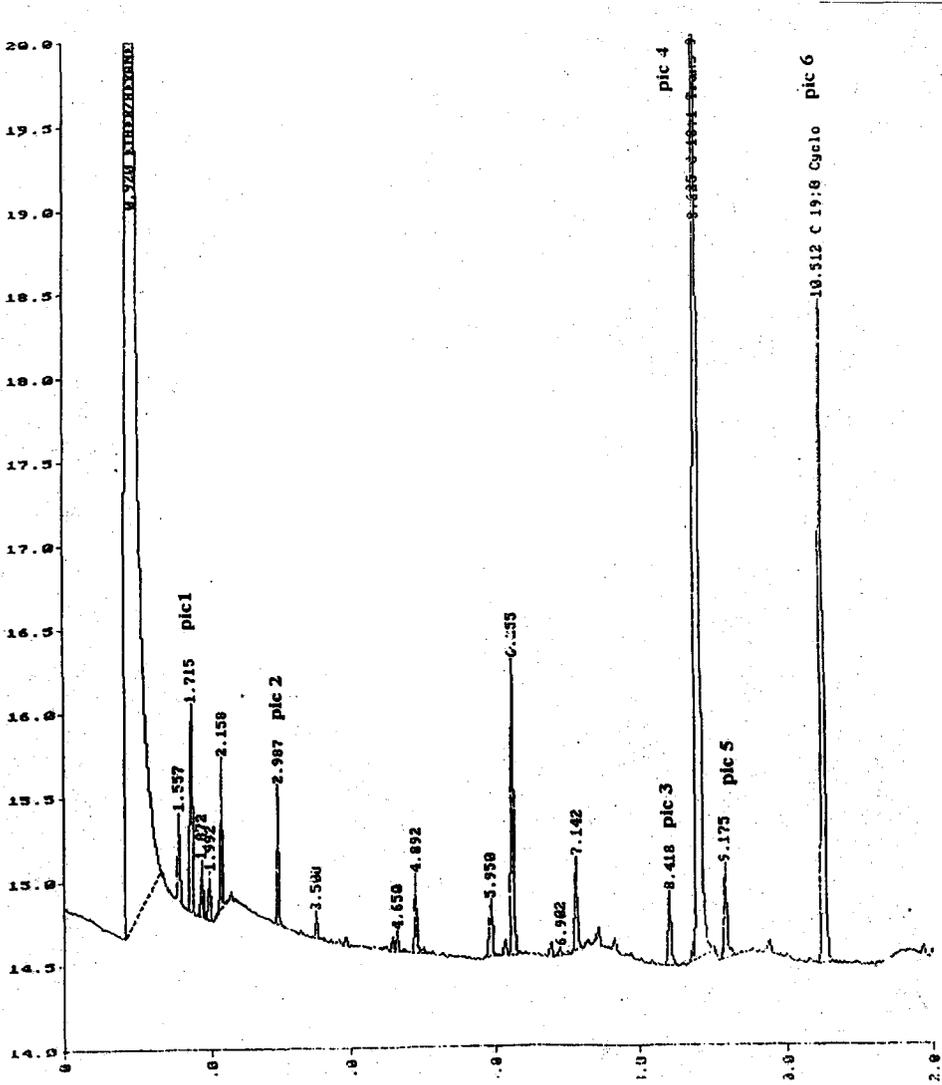


Figure 6. Profil chromatographique du biovar 2 avec les pics 1, 2, 3, 4, 5 et 6

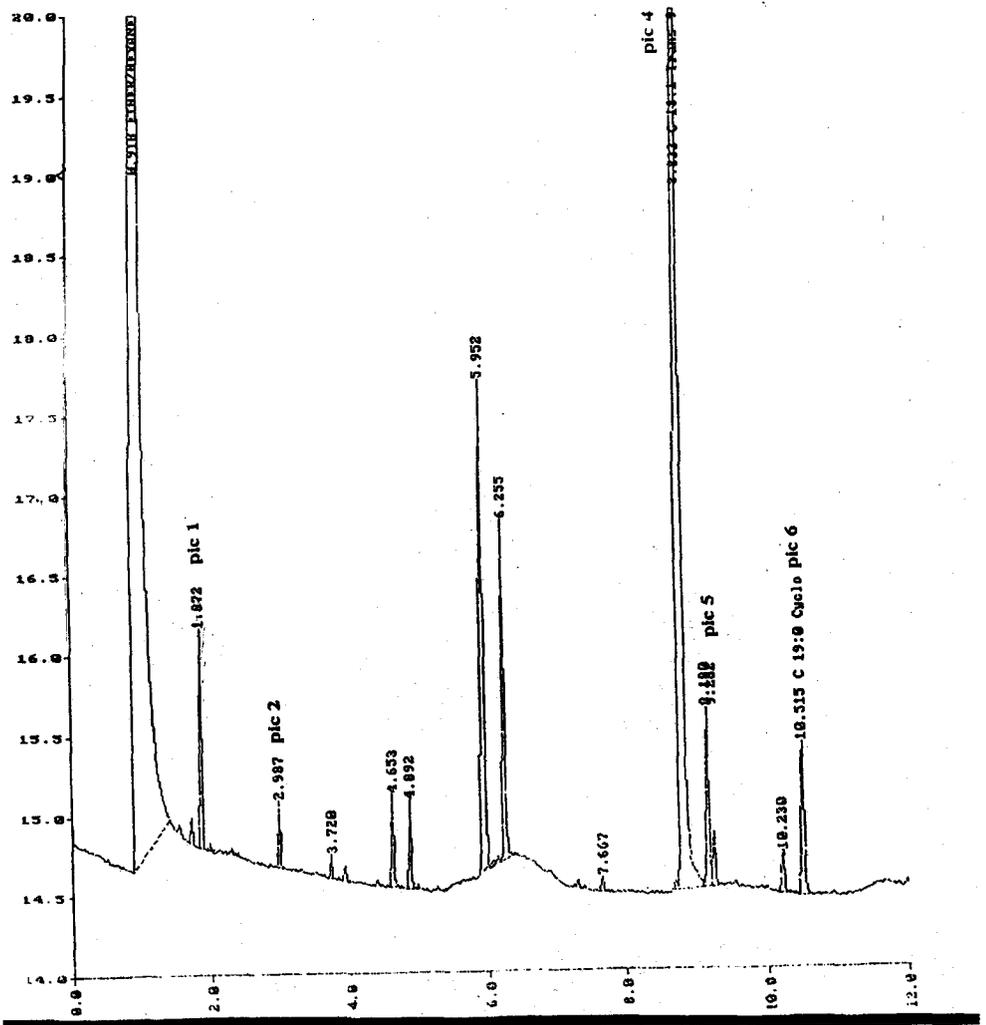


Figure 7. Profil chromatographique du biovar 3 avec les pics 1, 2, 3, 4 et 5

### Analyse des souches pures d'*Agrobacterium*

L'analyse de la collection des souches pures d'*Agrobacterium* du tableau 3, identifiées par les tests physiologiques usuels et du pouvoir pathogène (Benjama, Daoud 1989), sont soumises

test chromatographique. Cette technique a confirmé l'identité des *Agrobacterium* et leurs biovars (tableau 6)( fig.8 et fig.9). Cependant, elle n'a pu identifier d'autres souches (42 %) même si celles-ci sont considérées comme pathogènes vu les tumeurs qu'elles produisent sur plantes indicatrices (tomate, datura et kalanchoë).

La fiabilité de la technique est donc mise en cause et peut être imputée à la qualité de l'extraction des acides gras. Une répétition de cette extraction s'impose au moins trois fois.

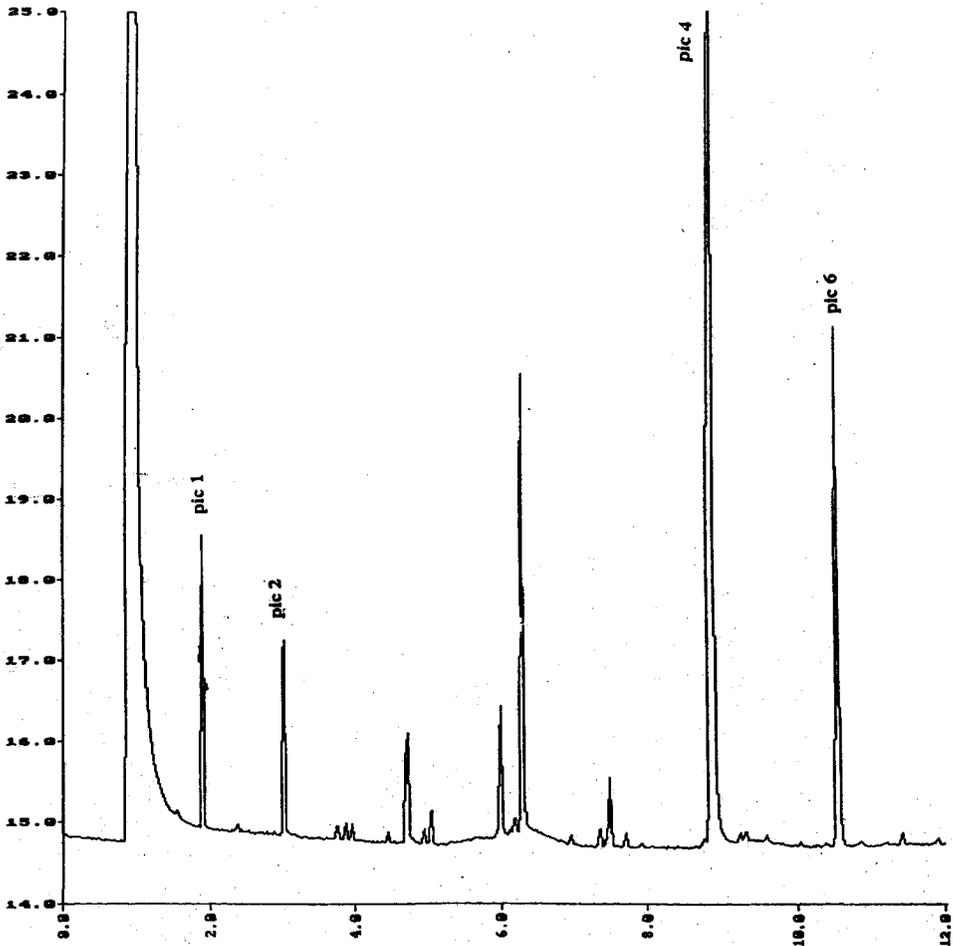


Figure 8. Exemple de souche 141.1 ayant le profil chromatographique

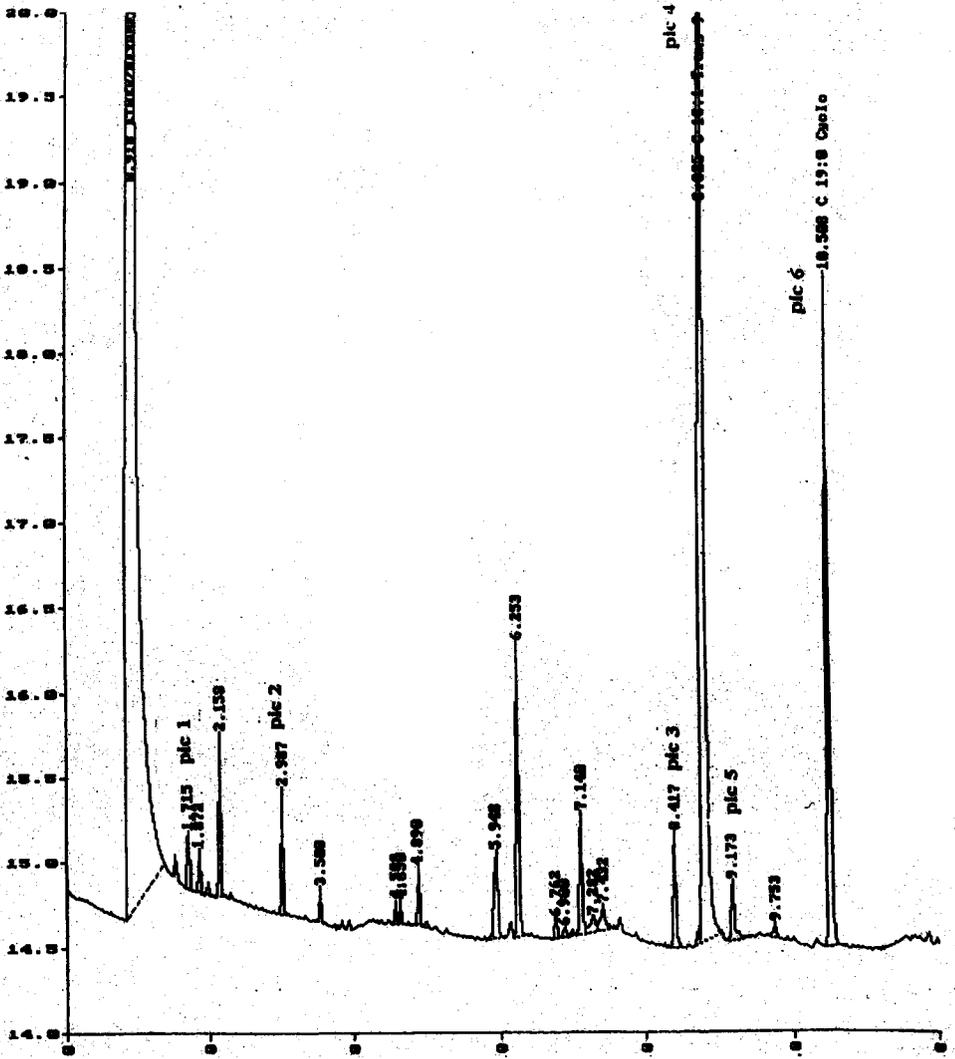


Figure 9. Exemple de souche 141.13 ayant le profil chromatographique du biovar 2

**Tableau 6.** Caractérisations de la collection d'*Agrobacterium* par chromatographie en phase gazeuse

n° de souche	nombre	biovar	%
72.18 * - 103.36* - 121.10 - 121.20 - 136.4 - 141.1* 141.5* - 141.9* - 141.10 - 208.42 - 208.43 - At68* - At 82143*.	13	1	36
141.13 * - 103.16* - 121.1* - 121.27 - 121.87 - 142.7* - 193.16* - 203.27*	8	2	22
103.18 * - 103.21* - 121.90* - 135.5* - 134.10 - 141.2 - 141.12* - 193.67* - 201.12* - 208.3* -208.41 - 209.3* - 214.2 * - 214.4 * - 214.16	15	ni**	42

\* souches produisant des tumeurs sur plantes indicatrices.

\*\* non identifiées par chromatographie malgré leur pathogénicité.

## Analyse des souches isolées à partir des tumeurs.

Les souches isolées à partir des tumeurs de racines de pêcher (échantillons 226, 227, 229, 230) et d'amandier (échantillon 321) (tableau 4) et identifiées par les critères morphologiques à savoir des colonies blanches, bombées, lisses et brillantes à contour régulier et de 1 à 2mm de diamètre; et les tests préliminaires à savoir le Gram négatif, le King b (1954) négatif et le métabolisme oxydatif ou inerte sur milieu Hugh et Leifson (1953) sont identifiées directement par chromatographie.

Il ressort du tableau 7 que le biovar 2 est plus important que le biovar 1 d'une part, et d'autre part, on trouve les deux biovars au niveau de la même tumeur chez le pêcher alors qu'on n'a trouvé que le biovar 2 chez l'amandier (fig.10). Cependant, on ne peut pas situer la (ou les) souche (s) pathogène (s). L'inoculation des plantes indicatrices s'impose. Le chromatographe n'a pu identifier 3 souches qui sont considérées comme *Agrobacterium* vu les tests physiologiques conformes. On peut imputer encore une fois cette défaillance à l'extraction des acides gras. Cependant le pourcentage des indéterminées (16 %) est inférieure au précédent concernant les souches pures (tableau 6) car elles sont fraîchement isolées.

**Tableau 7.** Souches d'*Agrobacterium* par biovar

n° de souche	nombre	biovar	%
226.5 - 227.2 - 229.23 - 230.11 - 230.13 -	5	1	26
227.4 - 229.2 - 229.20 229.26 - 229.29 - 230.19 230.37 - 230.49 - 321.1 321.3 - 321.5 -	11	2	58
229.30 - 230.3 - 321.6	3	id*	16

\*: indéterminé.

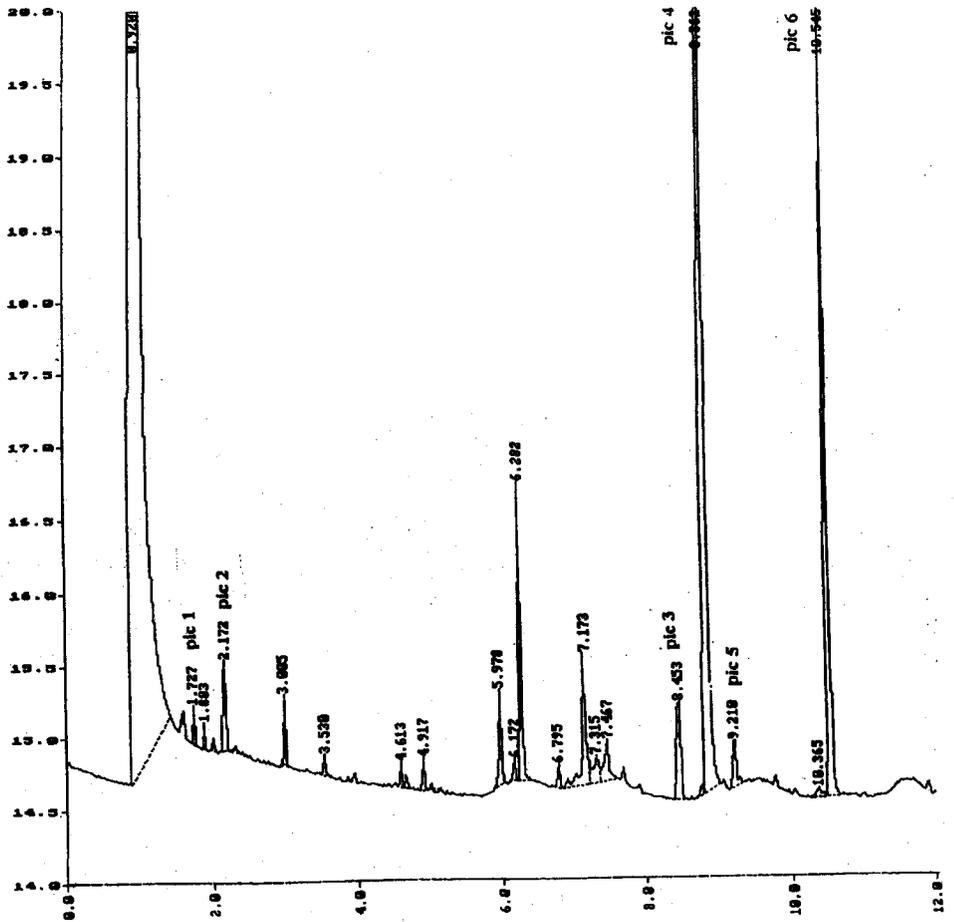


Figure 10. Exemple de souche 321. 1 ayant le profil chromatographique du biovar 2

### Analyse des souches isolées de plants de pépinières

Les souches isolées sur milieu sélectif du biovar 1 et du biovar 2 selon Brisbane and Kerr (1983) ; suivant le caractère morphologique des colonies décrit dans le paragraphe précédent (3.3) ; à partir de plants sans symptômes issus des pépinières privées (Ouahi et Idar) et publiques (SODEA) de Marrakech ont montré la présence d'*Agrobacterium* (tableau 8). Cependant le biovar 1 est plus représenté dans la population d'*Agrobacterium*. Il faut remarquer que cette population n'a pas subi les tests physiologiques mais clonée directement à partir des milieux spécifiques car c'est le but de la technique selon les auteurs (Bien *et al.*, 1990 ; Jäger *et al.*,

1989 a et b). Les chromatogrammes conformes à ceux du biovar 1 et 2 sont considérés comme *Agrobacterium* biovar 1 (fig. 11) et biovar 2 (fig. 12). Les colonies ayant l'aspect morphologique d'*Agrobacterium* et dont les profils d'acides gras sont non conformes à ces deux chromatogrammes sont considérées comme négatifs et donc éliminées. Cependant, on ne peut pas parler d'agents pathogènes.

D'autre part, on constate que l'*Agrobacterium* est isolé aussi bien de la partie aérienne du plant (apicale, intermédiaire et basale), et au niveau du sol de la rhizosphère (cas de sol d'abricotier de Ouahi).

**Tableau 8.** Souches d'*Agrobacterium* identifiées par biovar

souches	nombre	biovar	%
467.1 i - 470.2 a - 470.3 i - 470.4 b 470.5 i - 474.3 i - 475.1 i - 475.2 b 476.2 s	9	1	47
464.1 b - 475.3 b - 476.2 s	3	2	16
N90 - R10 - 470.6 b - 470.7 g - 470.8 b 473.1 b - 476.1 s -	7	-	37

- : isolement négatif (pas *Agrobacterium*)

i : isolement à partir de la zone intermédiaire du plant

a :	“	“	“	apicale	“
b :	“	“	“	basale	“
g :	“	“	“	de greffage	“
s :	“	“	“	sol de la rhizosphère	

Une synthèse des pépinières montre que toutes les pépinières hébergent l'*Agrobacterium* d'une manière très aléatoire (tableau 9). Si l'abricotier par exemple est épargné chez Ouahi et Idar, il ne l'est pas à la SODEA. Par contre, le sol planté par l'abricotier est contaminé chez Ouahi. Donc il n'y a pas de règle absolue, néanmoins, les rosacées à pépins (pommier et poirier) sont indemnes.

**Tableau 9.** Synthèse des espèces par pépinières hébergeant l'*Agrobacterium*

pépinière	plante hôte	présence <i>Agrobacterium</i>
Ouahi	pommier (463)	non
	abricotier (465)	non
	racines abricotier (R 10)	non
	amandier (466)	non
	rosier (464)	oui (B2)
	prunier (470)	oui (B1)
	sol abricotier (474.2)	oui (B1)
Idar	pêcher (467)	oui (B1)
	cognassier (468)	non
	poirier (472)	non
	abricotier (471)	non
Sodea	pommier (473)	non
	amandier (474)	oui (B1)
	abricotier (475)	oui (B1 et B2)
	sol amandier (476.1)	non

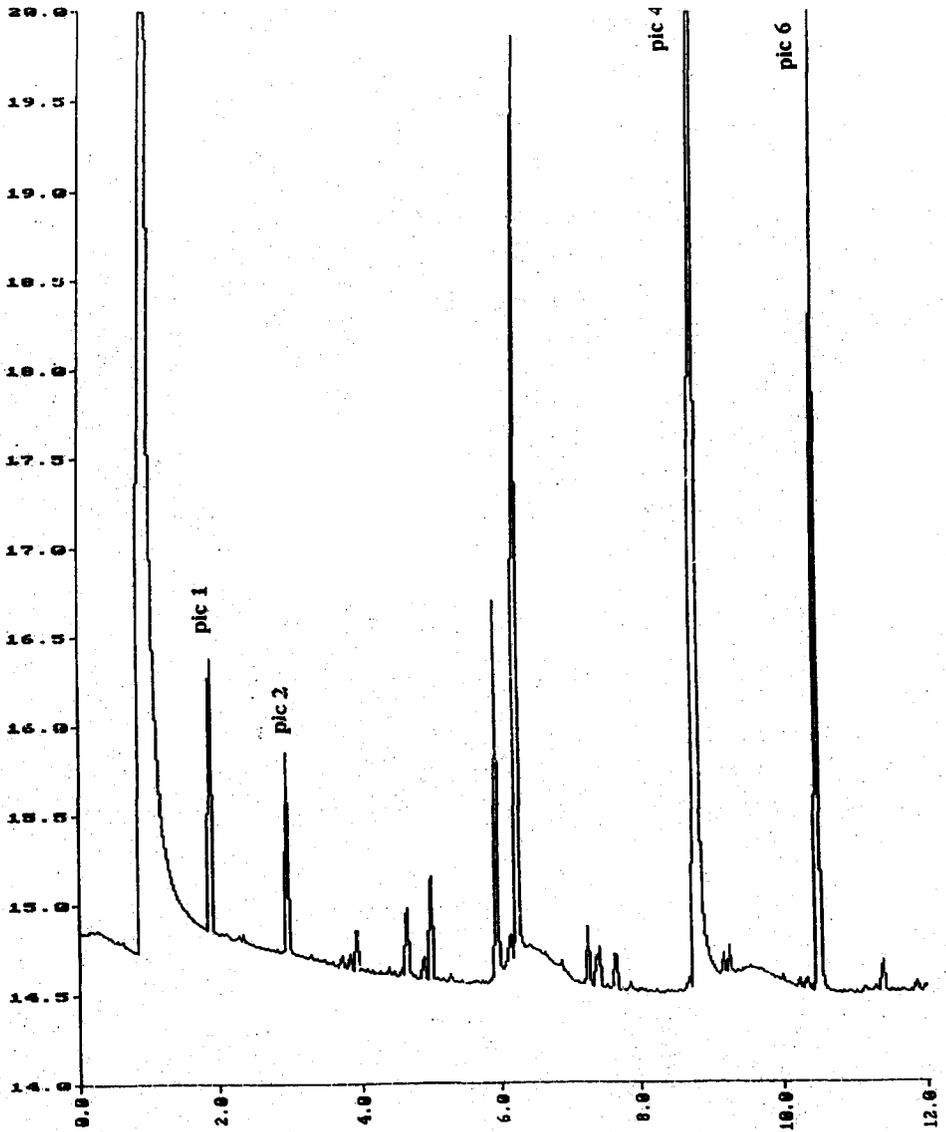


Figure 11. Exemple de souche 470.2 isolée du prunier avec profil chromatographique du biovar 1

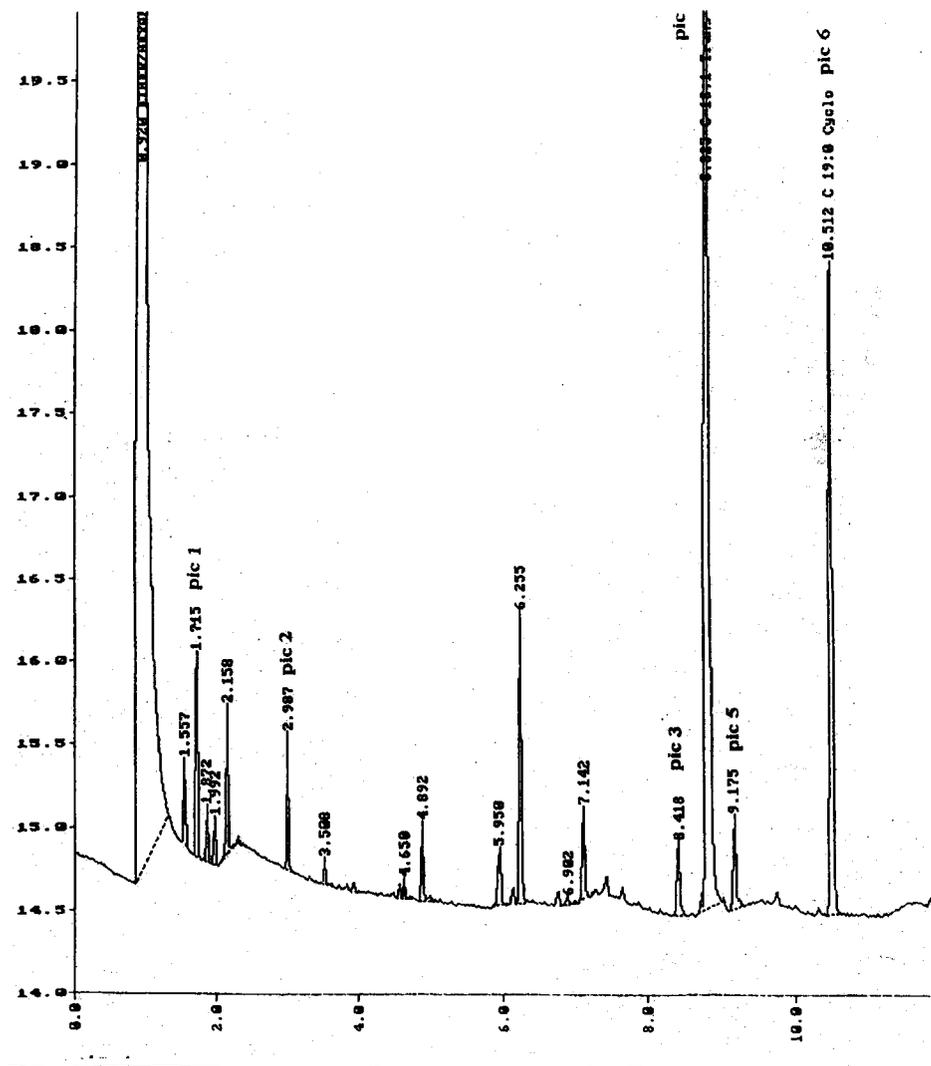


Figure 12. Exemple de souche 464.1b isolée du rosier ayant le profil chromatographique du biovar 2.

## Conclusion

Vu les résultats de ce travail, on peut conclure que la chromatographie en phase gazeuse est un instrument très utile dans l'identification des souches bactériennes pour plusieurs raisons :

- Elle permet l'identification de 82 souches en même temps et en une seule nuit. Ce qui permet de gagner beaucoup de temps par rapport aux méthodes usuelles utilisées (Caractérisation morphologique et biologique). Cependant, les critères fixés par la méthode doivent être définis et étalonnés avec précision.
- C'est une méthode précise. Elle permet en plus le stockage des données sur disque dur ou sur disquette et leur utilisation à tout moment.
- La méthode d'extraction des acides gras demande un matériel et des produits chimiques appropriés et surtout des conditions de travail (température et bouteille d'H<sub>2</sub> et d'hexane) appropriés. L'extraction une fois faite, l'extrait est scellé en ampoules et peut être traité à tout moment.

Cependant, les inconvénients de cette technique dans l'identification des *Agrobacterium* restent majeurs :

- La technique ne distingue pas entre l'agent *Agrobacterium* pathogène et non pathogène car la population d'*Agrobacterium* des rosacées fruitières possède cette situation pour les deux biovars 1 et 2, alors que le biovar 3 de la vigne est à 100 % pathogène.
- Cette technique sera plus utile dans un schéma de sélection variétale car l'échantillonnage se fera par lignée, et analysé. Si l'échantillon héberge l'*Agrobacterium*, on peut considérer que la lignée est atteinte. Cependant, on ne peut pas parler d'agent pathogène sauf si, on inocule des plantes indicatrices.

La méthode de dépistage des plants de pépinières au niveau national est très difficile à réaliser sinon impossible car il faut analyser systématiquement chaque plant qui sera détruit suite à sa manipulation. En plus l'épidémiologie est difficile à étudier car on ne connaît pas l'origine des boutures et des portes greffes tout venant sauf chez les entreprises plus structurées telle que la SODEA.

- Le dépistage de l'*Agrobacterium* dans le sol est aussi difficile car la distribution de l'agent bactérien est aléatoire.

## Remerciements

Nous remercions le Directeur de l'INRA, Mr Faraj, et le Directeur de la DPVCTRE, Mr Arifi, et la GTZ en la personne de Mme Rolf qui ont contribué d'une manière très professionnelle à la réalisation de ce travail. Nous remercions aussi Mr Jäger de Neuschat- Allemagne pour l'initiation à la chromatographie malgré les difficultés de communication. Nous remercions enfin Mr Apt de la société Technilab pour l'installation du matériel.

## Références

- Benjama Ah., 1992. Rapport bitrimestrielle sur l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse dans le dépistage de l'Agrobacterium au Maroc. INRA-Convention GTZ n° 84.2070.5.
- Benjama Ah. et Schlüter K., 1978. Le crown-gall sur vigne. Bulletin de la protection des cultures (INRA, Rabat). 5 : 29-32.
- Benjama Ah. et Daoud S., 1989. Caractérisation en biovars des isolats marocains d'Agrobacterium issus de tumeurs racinaires des rosacées fruitières. Agronomie 9(9) : 897-890.
- Benjama Ah., N. Alami et EM. Saadaoui, 1996. Caractérisation sérologique des souches marocaines d'Agrobacterium tumefaciens, agent du crown-gall des rosacées fruitières. Agronomie 16(8) : 517-522.
- Bien E., D. Lorenz, K. Eichhorn and R. Plapp, 1990. Isolation and characterization of Agrobacterium tumefaciens from the german vineregion rheinpfalz. J. Plant dis. and Prot. 97 (3) : 313-322.
- Brisbane P.G. and Kerr A., 1983. Selective media for three biovars of Agrobacterium. J. appl. Bacteriol., 54 : 425-431.
- Burr T. and Kalz B.H., 1983. Isolation of Agrobacterium tumefaciens biovar 3 from grapevine galls and sap and from vineyard soil. Phytopathol. 73 : 163-165.
- Chilton M.D., Drummond M.H., Sciakry D.J., Montoya A.L., Gordon M.P., Nester E.W., 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells. The molecular basis of crown-gall tumorigenesis cell, 11 : 263-271.
- Jäger J., D. Lorenz, R. Plapp and K.W. Eichhorn, 1989 a. Latent occurrence of Agrobacterium tumefaciens biovar 3 in grapevine (Vitis vinifera L.). Vitic. Enol. Sci. 44 : 14-20.
- Jäger J., K.T. Frankmann, D. H. Lorenz and K.W. Eichhorn, 1989 b. The indexing of grapevine propagating material latently infected by Agrobacterium tumefaciens biovar 3-isolate identification by gas chromatography of whole cell fatty acids. Vitic. Enol. Sci. 44 : 177-182.
- Hugh R.8. Leifson E., 1953. The taxonomic significant of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. J. Bact., 66, 24-26.
- King E. O., Ward M. K. & Raney D. E., 1954. Two simple media for demonstration of piocyanin and fluorescein. J. Lab. and Chem., 44, 301-307.
- Krieg N.R. and Holt J.G., 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. vol. 1- Williams & Wilkins, Baltimore-London.
- Loubser J .T., 1978. Identification of Agrobacterium tumefaciens biotype3 on grapevine in South Africa. Plant Dis. Repr. 62 : 730-731.
- Miller L. & Berger T., 1985. Bacteria identification by Gas Chromatography of whole cell fatty acids. Gas Chromatography, Hewlett Packard application : 228-241.
- Süle S., 1978. Biotypes of Agrobacterium tumefaciens in Hungary. J. appl. Bact. 44 : 207-213.
- Watson B., Currier T.C., Gordon M.P., Chilton M.D., Nester E.W., 1975. Plasmid required for virulence of Agrobacterium tumefaciens. J. Bacteriol. 123 : 255-264.