

Article

« Comparaison de techniques d'identification des *Erwinia* et des *Pseudomonas* responsables de la pourriture molle »

M. Lacroix, L. Vézina, S. Desjardins et C. Beaulieu

Phytoprotection, vol. 76, n° 1, 1995, p. 27-37.

Pour citer cet article, utiliser l'information suivante :

URI: <http://id.erudit.org/iderudit/706082ar>

DOI: 10.7202/706082ar

Note : les règles d'écriture des références bibliographiques peuvent varier selon les différents domaines du savoir.

Ce document est protégé par la loi sur le droit d'auteur. L'utilisation des services d'Érudit (y compris la reproduction) est assujettie à sa politique d'utilisation que vous pouvez consulter à l'URI <https://apropos.erudit.org/fr/usagers/politique-dutilisation/>

Érudit est un consortium interuniversitaire sans but lucratif composé de l'Université de Montréal, l'Université Laval et l'Université du Québec à Montréal. Il a pour mission la promotion et la valorisation de la recherche. Érudit offre des services d'édition numérique de documents scientifiques depuis 1998.

Pour communiquer avec les responsables d'Érudit : info@erudit.org

Comparaison de techniques d'identification des *Erwinia* et des *Pseudomonas* responsables de la pourriture molle

Michel Lacroix¹, Lise Vézina¹, Suzanne Desjardins¹ et Carole Beaulieu²

Reçu 1994-07-07; accepté 1994-12-15

Trois méthodes, soit la caractérisation physiologique, l'utilisation de systèmes miniaturisés d'identification (API 20E, API NFT et Biolog) et l'analyse du profil électrophorétique des protéines sécrétées, ont été expérimentées afin de déterminer une technique précise et rapide d'identification des *Pseudomonas* et des *Erwinia* responsables de la pourriture molle. L'analyse des patrons électrophorétiques des protéines sécrétées est une méthode très efficace pour identifier les différentes espèces pectinolytiques de *Pseudomonas* fluorescents. Le système Biolog reconnaît efficacement le *P. marginalis* et le *P. viridiflava*. Le système API NFT est efficace pour l'identification du *P. marginalis*, du *P. viridiflava* et du *P. syringae*. C'est le système API 20E qui s'est avéré le plus efficace pour l'identification des *Erwinia*. L'électrophorèse des protéines sécrétées et le système API NFT permettent une identification rapide et efficace des *Pseudomonas*, tandis que pour les *Erwinia*, seul le système API 20E est performant.

Lacroix, M., L. Vézina, S. Desjardins, and C. Beaulieu. 1995. Comparison of identification methods for *Erwinia* and *Pseudomonas* species causing soft rot diseases. PHYTOPROTECTION 76 : 27-37.

Three methods, namely physiological characterization, the use of miniaturized identification systems (API 20E, API NFT, and Biolog) and the analysis of the electrophoretic profile of proteins secreted by the bacteria, were used in order to determine a precise and quick identification technique for the *Pseudomonas* and *Erwinia* species causing soft rots in several plant species. The analysis of the electrophoretic profile of the proteins secreted is a very efficient method of identification for the various pectinolytic species of fluorescent *Pseudomonas*. The Biolog system accurately recognizes *P. marginalis* and *P. viridiflava*. The API NFT system is efficient for the identification of *P. marginalis*, *P. viridiflava* and *P. syringae*. The API 20E system was found to be the most reliable system for identifying *Erwinia* species. The electrophoresis of proteins secreted and the API NFT system allow a quick and efficient identification of *Pseudomonas* species, while for *Erwinia* species, only the API 20E system is efficient.

-
1. Service de phytotechnie de Québec, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Complexe scientifique, 2700, rue Einstein, Sainte-Foy (Québec), Canada G1P 3W8
 2. Département de biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke (Québec), Canada J1K 2R1

INTRODUCTION

Le laboratoire de diagnostic du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) reçoit chaque année de nombreuses plantes cultivées atteintes de la pourriture molle. Entre 1989 et 1993, la pourriture molle a été la maladie bactérienne la plus souvent diagnostiquée, avec 216 diagnostics positifs sur 561 échantillons ayant des symptômes causés par des bactéries. Les agents bactériens responsables de la pourriture molle appartiennent à plusieurs genres : *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Flavobacterium*, *Cytophaga* et *Xanthomonas* (Liao et Wells 1987a; Lund 1983). Les bactéries pectinolytiques des genres *Erwinia* et *Pseudomonas* sont cependant les plus fréquentes en Amérique du Nord (Cappellini *et al.* 1987; Ceponis *et al.* 1985; Gitaitis *et al.* 1991; Hildebrand 1989; Liao et Wells 1987b; Pieczarka et Lorbeer 1975).

Différentes méthodes ont été utilisées pour identifier les *Erwinia* et les *Pseudomonas* pectinolytiques : la caractérisation des bactéries selon des critères physiologiques (Dickey et Kelman 1988; Hildebrand *et al.* 1971; Lelliott *et al.* 1966), l'analyse sérologique (Dickey *et al.* 1984; Samson *et al.* 1987), l'hybridation ADN-ADN (Palleroni 1984), la comparaison des profils protéiques (Van Zyl et Steyn 1990), le polymorphisme des fragments de restriction de l'ADN (RFLP) (Boccaro *et al.* 1991; Ward et De Boer 1994) et l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) (Darrasse *et al.* 1994). Plusieurs de ces techniques sont laborieuses, coûteuses ou requièrent de l'équipement spécialisé. Certaines compagnies offrent donc aux laboratoires faisant de l'identification bactérienne de façon routinière, des systèmes miniaturisés d'identification (API 20E, API NFT, Biolog, etc.) qui permettent d'évaluer rapidement plusieurs propriétés physiologiques et biochimiques des bactéries.

Au laboratoire de diagnostic du MAPAQ, les bactéries pectinolytiques des genres *Pseudomonas* fluorescents et *Erwinia* sont identifiées de façon routinière selon les critères physiologiques proposés par Dickey et Kelman (1988), et par Lelliott *et al.* (1966). Ce travail compare l'efficacité

de différents systèmes (API 20E, API NFT, Biolog) à identifier les bactéries pectinolytiques des genres *Pseudomonas* fluorescents et *Erwinia*. L'analyse des profils protéiques est une excellente méthode pour différencier les sous-espèces ou les pathovars de différentes espèces de bactéries phytopathogènes (Paradis *et al.* 1994; Van Zyl et Steyn 1990). Toutefois, comme cette méthode requiert de nombreuses étapes de manipulation, telles que lyse des cellules, extraction et dosage des protéines, électrophorèse, lecture et comparaison des profils électrophorétiques, il devient difficile de l'utiliser de façon routinière. Nous avons plutôt comparé le profil électrophorétique des protéines sécrétées par les bactéries de la pourriture molle. Cette méthode aurait l'avantage d'éliminer les étapes de lyse cellulaire et d'extraction protéique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Isolement des bactéries pectinolytiques

Les bactéries ont été isolées des tissus situés immédiatement sous la zone de pourriture molle. Un morceau de tissu d'environ 1 cm³ a été prélevé et déposé dans 2 mL d'eau physiologique (NaCl 0,85 %) pendant 30 min. À l'aide d'une micropipette, 100 µL de cette eau de trempage a été prélevée et transférée dans des boîtes de Pétri contenant du milieu MS (Miller et Schroth 1972) ou du milieu B de King (King *et al.* 1954). Les colonies présentant les caractéristiques des *Erwinia* (colonies orangées ayant une marge dentelée sur le milieu MS) ou des *Pseudomonas* (colonies produisant une fluorescence sur le milieu B de King) ont été purifiées par des repiquages successifs sur des milieux de culture. La liste des bactéries utilisées dans ce travail est donnée au tableau 1.

Caractérisation physiologique des bactéries

Les souches de *Pseudomonas* fluorescents ont été identifiées au niveau de l'espèce selon les critères suivants : production de lévane (Lelliott *et al.* 1966), réaction d'oxydase (Lelliott *et al.* 1966), activité pectinolytique (Hildebrand 1971), production d'arginine déshydrolase et

Tableau 1. Liste des souches bactériennes de *Pseudomonas* et d'*Erwinia* utilisées

Souche n°	Identification par des tests physiologiques	Isolée de	Provenance
51	<i>P. marginalis</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	P.D. Hildebrand
94	<i>P. marginalis</i>	<i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i>	MAPAQ ^a
95	<i>P. marginalis</i>	<i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i>	MAPAQ
101	<i>P. marginalis</i>	<i>Apium graveolens</i> var. <i>dulce</i>	MAPAQ
114	<i>P. marginalis</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	MAPAQ
176	<i>P. marginalis</i>	<i>Allium cepa</i>	MAPAQ
192	<i>P. marginalis</i>	<i>Allium cepa</i>	MAPAQ
194	<i>P. marginalis</i>	<i>Allium cepa</i>	MAPAQ
215	<i>P. marginalis</i>	<i>Aconitum</i> sp.	MAPAQ
221	<i>P. marginalis</i>	<i>Aconitum</i> sp.	MAPAQ
292	<i>P. marginalis</i>	<i>Lactuca sativa</i>	MAPAQ
357	<i>P. marginalis</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	MAPAQ
58	<i>P. viridiflava</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	P.D. Hildebrand
59	<i>P. viridiflava</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	P.D. Hildebrand
78	<i>P. viridiflava</i>	<i>Chrysanthemum</i> sp.	J.F. Chauveau
183	<i>P. viridiflava</i>	<i>Solanum melongena</i> var. <i>esculentum</i>	MAPAQ
97	<i>P. syringae</i>	<i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i>	MAPAQ
135	<i>P. syringae</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	MAPAQ
136	<i>P. syringae</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	MAPAQ
137	<i>P. syringae</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	MAPAQ
57	<i>P. fluorescens</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	P.D. Hildebrand
110	<i>P. fluorescens</i>	<i>Fœniculum</i> sp.	MAPAQ
115	<i>P. fluorescens</i>	<i>Gerbera jamesonii</i>	MAPAQ
120	<i>P. fluorescens</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	MAPAQ
129	<i>P. fluorescens</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	MAPAQ
142	<i>P. fluorescens</i>	<i>Brassica campestris</i> var. <i>pekinensis</i>	MAPAQ
296	<i>P. fluorescens</i>	<i>Lactuca sativa</i>	MAPAQ
322	<i>P. fluorescens</i>	<i>Cucumis sativus</i>	MAPAQ
326	<i>P. fluorescens</i>	<i>Cucumis sativus</i>	MAPAQ
331	<i>P. fluorescens</i>	<i>Cucumis sativus</i>	MAPAQ
13	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	ATCC15713
15	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	<i>Daucus carota</i> var. <i>sativus</i>	ATCC25206
16	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	ATCC25270
74	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	J.F. Chauveau
130	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	MAPAQ
138	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	MAPAQ
153	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	MAPAQ
162	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	<i>Schlumbergera</i> sp.	MAPAQ
163	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	<i>Schlumbergera</i> sp.	MAPAQ
166	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	<i>Schlumbergera</i> sp.	MAPAQ
169	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	<i>Schlumbergera</i> sp.	MAPAQ
172	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	<i>Lilium</i> sp.	MAPAQ
182	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	<i>Euphorbia</i> sp.	MAPAQ
226	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	<i>Cucumis sativus</i>	MAPAQ
239	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	MAPAQ
375	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	<i>Lactuca sativa</i>	MAPAQ
382	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	MAPAQ
413	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	MAPAQ
22	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>atroseptica</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	ATCC33260
62	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>atroseptica</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	MAPAQ
157	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>atroseptica</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	MAPAQ
690	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>atroseptica</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	MAPAQ
707	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>atroseptica</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	MAPAQ
749	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>atroseptica</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	MAPAQ

^a Souche isolée et caractérisée au laboratoire de diagnostic du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec.

hypersensibilité sur tabac (Lelliott *et al.* 1966). Pour certaines souches, un test supplémentaire a été ajouté, la production d'acide à partir de saccharose (Lelliott *et al.* 1966).

Les souches d'*Erwinia* ont été identifiées au niveau de la sous-espèce selon les critères suivants : production d'oxydase, de catalase, de pectinase et d'indole, réduction du saccharose, production d'acide à partir d' α -méthyle glucoside, utilisation du glucose en conditions anaérobiques et croissance à 36°C. Pour certaines souches, deux tests supplémentaires ont dû être faits (production d'acide à partir de tréhalose et utilisation du malonate). Tous ces tests ont été effectués selon les protocoles proposés par Dickey et Kelman (1988).

Systèmes miniaturisés d'identification

L'utilisation des systèmes API 20E [bioMérieux Canada inc., Saint-Laurent (Québec)], API NFT [bioMérieux Canada inc., Saint-Laurent (Québec)] et Biolog version 3.0 (Biolog inc., Hayward, Californie) a été faite en suivant les recommandations des manufacturiers. Les souches à tester provenaient d'une culture de 24 h sur du *Triptic Soy Agar* (Difco) pour les tests Biolog, et d'une culture de 24 h sur une gélose nutritive NGA (*nutrient glucose agar*) pour les tests API 20E et API NFT. Les incubations se faisaient à 30°C durant 24 h pour les tests API 20E et Biolog, et durant 48 h pour le test API NFT. Chaque souche de *Pseudomonas* a été testée trois fois sur les galeries API NFT et Biolog, alors que les souches d'*Erwinia* ont été testées trois fois sur les galeries API 20E et Biolog.

Électrophorèse des protéines sécrétées

Les protéines sécrétées ont été obtenues à partir de cultures liquides de 24 h qui se sont développées à 26°C dans le milieu M9 (Maniatis *et al.* 1982). Les cellules bactériennes ont été éliminées du surnageant par une centrifugation à 10 500 g pendant 15 min, suivie d'une filtration sur un filtre de cellulose avec des pores de 0,22 μ m. Les protéines ont été concentrées en centrifugeant le surnageant dans un Centricon-10 (Amicon) à 4 500 g pendant

60-90 min, ce qui permettait d'éliminer les composés de masse moléculaire inférieure à 10 kDa. Un dosage des protéines a alors été effectué par colorimétrie (*Protein Assay*, Biorad) afin d'analyser des quantités équivalentes de protéines pour chaque échantillon. Le gel de concentration contenait 4% de polyacrylamide (pH 6,7) et le gel de séparation contenait 12% de polyacrylamide (pH 8,9). L'électrophorèse a été effectuée selon la méthode de Laemmli (1970). Les gels ont été colorés au nitrate d'argent (Hames 1990). Les protéines ont été extraites au moins trois fois pour chaque souche bactérienne.

RÉSULTATS

Caractérisation physiologique

À l'aide de tests physiologiques, 54 souches de *Pseudomonas* et d'*Erwinia*, dont 44 ont été isolées au laboratoire de diagnostic, ont été caractérisées. Les 44 souches isolées au laboratoire de diagnostic du MAPAQ provenaient toutes de spécimens de plante différents; 19 de ces souches appartenaient au genre *Erwinia* et les 25 autres appartenaient au genre *Pseudomonas* (tableau 1). Les espèces les plus souvent isolées ont été l'*E. carotovora* ssp. *carotovora* (Jones) Bergey *et al.*, le *P. fluorescens* IVb (Trevisan) Migula et le *P. marginalis* (Brown) Stevens. Nous avons également identifié des souches de *P. viridiflava* (Burkholder) Dowson et de *P. syringae* van Hall. Un seul test physiologique permettait de distinguer ces deux dernières espèces, soit la production d'acide à partir de saccharose, car le *P. syringae* produit de l'acide. De plus, des souches ont été identifiées comme *E. carotovora* ssp. *atroseptica* (van Hall) Dye. Les souches 166 et 169 produisaient de l'indole, ce qui caractérise l'*E. chrysanthemi* Burkholder, McFadden et Dimock. Cependant, nous avons classé ces deux souches dans le groupe des *E. carotovora* ssp. *carotovora*, parce que les autres propriétés physiologiques de ces souches, dont la production d'acide à partir de tréhalose et l'incapacité à utiliser le malonate, les apparentaient à l'*E. carotovora* ssp. *carotovora*.

Identification des souches de *Pseudomonas* par API NFT et Biolog

Le système Biolog (version 3) a identifié 9 des 12 souches de *P. marginalis* (selon les tests physiologiques) à au moins deux reprises comme étant le *P. marginalis*. Le système Biolog a fourni cette identification à 25 reprises sur les 36 tests réalisés. Pour 10 des 36 tests effectués, l'identification la plus probable a été *P. corrugata*; cependant la deuxième identification la plus probable était alors *P. marginalis*. Trois codes API NFT (1557555, 1757555 et 1557455) ont été fréquemment associés à ces souches; 11 des 12 souches ont obtenu, à deux ou trois reprises, un de ces trois codes les plus fréquents (tableau 2).

Plusieurs des souches de *P. fluorescens* (selon les tests physiologiques) n'ont pu être identifiées à l'espèce en utilisant le système Biolog. En effet, dans 40% des cas, le pourcentage de similarité entre nos souches et celles de la banque de données était inférieur à 50%. Toutefois, en se basant sur l'identification la plus probable (que le pourcentage de similarité soit inférieur ou supérieur à 50%), les identifications les plus fréquentes pour les 30 tests réalisés sont *P. fluorescens* à 11 reprises, *P. marginalis* à cinq reprises

et *Pseudomonas* sp. à quatre reprises. Lors des essais avec les galeries API NFT, 24 codes différents ont été obtenus pour les 30 tests réalisés (tableau 2).

Il existe une excellente correspondance entre l'utilisation des tests physiologiques et l'utilisation du système Biolog pour identifier le *P. viridiflava*. Trois des quatre souches de *P. viridiflava* ont été identifiées comme telles, et ce, à trois reprises. Seule la souche 78 n'a été identifiée qu'à une seule reprise comme *P. viridiflava*. Le système Biolog ne réussit cependant pas à identifier les souches de *P. syringae*. Trois principaux codes API NFT étaient associés au *P. viridiflava* (0457451, 0457441 et 0447451). Deux codes principaux étaient associés au *P. syringae* (0477541 et 0477141) (tableau 2).

Électrophorèse des protéines sécrétées par les souches de *Pseudomonas*

Malgré le fait que les souches de *Pseudomonas* se soient développées en milieu minimal, un nombre relativement important de protéines ont été sécrétées dans le milieu de culture. De 6 à 18 protéines sécrétées ont été décelées dans les milieux de culture (fig. 1).

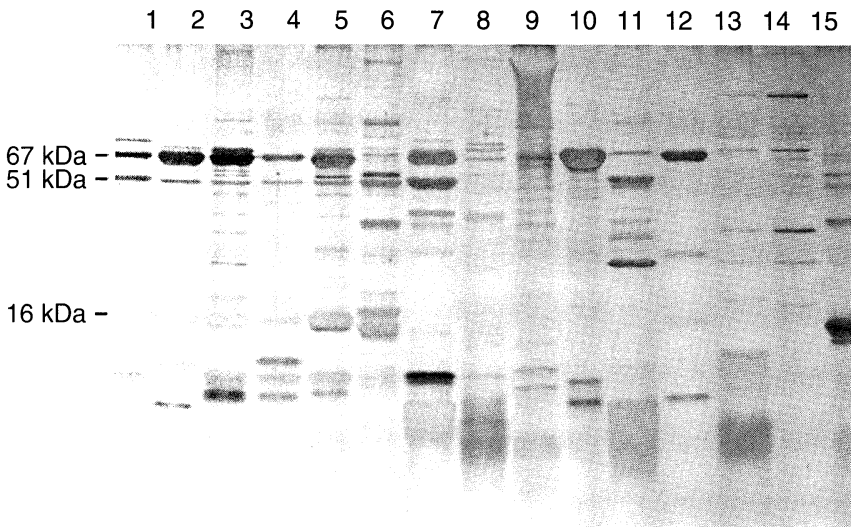


Figure 1. Électrophorèse des protéines sécrétées par des souches de *Pseudomonas* causant la pourriture molle. *P. marginalis*: puits 1-5, souches 115, 101, 95, 94 et 51, respectivement; *P. fluorescens*: puits 6-12, souches 296, 142, 129, 120, 114, 110 et 57, respectivement; *P. syringae*: puits 13 et 14, souches 135 et 97, respectivement; *P. viridiflava*: puits 15, souche 58. Les chiffres à gauche de la figure sont des indicateurs de masse moléculaire.

Tableau 2. Identification des souches de *Pseudomonas* par caractérisation physiologique et par les systèmes API NFT et Biolog version 3.0

Identification par des tests physiologiques	API NFT		Biolog	
	code	fréquence ^a	identification ^b	fréquence ^c
<i>P. marginalis</i>	1557555	13/36	<i>P. marginalis</i>	25/36
	1757555	8/36	<i>P. corrugata</i>	10/36
	1557455	5/36	<i>P. fluorescens</i>	1/36
	0557455	2/36		
	0157555	2/36		
	0157455	1/36		
	0157557	1/36		
	1547455	1/36		
	1555455	1/36		
	1557755	1/36		
1447475	1/36			
<i>P. viridiflava</i>	0457451	6/12	<i>P. viridiflava</i>	10/12
	0457441	2/12	<i>P. syringae</i>	1/12
	0447451	2/12	Aucune identification	1/12
	0450400	1/12		
	0457551	1/12		
<i>P. syringae</i>	0477541	6/12	Aucune identification	12/12
	0477141	3/12		
	0477551	1/12		
	0477553	1/12		
	0477573	1/12		
<i>P. fluorescens</i>	0157555	5/30	<i>P. fluorescens</i>	11/30
	0157557	2/30	<i>P. marginalis</i>	5/30
	0157577	2/30	<i>Pseudomonas</i> sp.	4/30
	0557455	1/30	<i>P. corrugata</i>	1/30
	0157455	1/30	<i>P. putida</i>	1/30
	0750457	1/30	Aucune identification	8/30
	0150457	1/30		
	0155457	1/30		
	5557577	1/30		
	1056557	1/30		
	1042445	1/30		
	1142445	1/30		
	0342757	1/30		
	0040457	1/30		
	0041457	1/30		
	5757555	1/30		
	7657555	1/30		
	7275555	1/30		
	0762757	1/30		
	0463757	1/30		
0663757	1/30			
1557555	1/30			
1757555	1/30			
1557557	1/30			

^a Nombre de fois que le code a été obtenu/nombre de tests réalisés avec les souches d'une même espèce.

^b Le système identifie une souche à l'espèce lorsque le taux de similarité est supérieur à 50%.

^c Nombre de fois que l'identification a été obtenue/nombre de tests réalisés avec les souches d'une même espèce.

Certaines caractéristiques du profil électrophorétique des différentes espèces de *Pseudomonas* ont été relevées. Trois bandes majeures étaient habituellement présentes dans le surnageant des souches de *P. marginalis*. La masse moléculaire des trois protéines était approximativement de 67, 51 et 16 kDa. Une seule souche faisait exception : la souche 114, chez qui seule la protéine de 67 kDa était présente.

Le profil protéique des souches de *P. fluorescens* contenait également une protéine de 67 kDa avec ou sans une protéine de 51 kDa (fig. 1). La quantité de ces protéines sécrétées dans le milieu de culture variait sensiblement entre les différentes souches de *P. fluorescens*. Cependant, pour une souche donnée, ces protéines étaient toujours en quantité plus importante. La protéine de 16 kDa ne se trouvait chez aucune souche, à l'exception de la souche 115. Une forte hétérogénéité était toutefois observée entre les souches de *P. fluorescens*. Aucune protéine majeure de 67 kDa ou de 51 kDa n'a été révélée dans le profil des souches de *P. viridiflava* et *P. syringae* (fig. 1).

Identification des souches d'*Erwinia* par API 20E et Biolog

Chez *E. carotovora* ssp. *carotovora*, 16 des 18 souches ont été identifiées comme telles à au moins deux reprises avec le système Biolog. Seulement trois souches d'*E. carotovora* ssp. *carotovora* ont été associées à l'*E. carotovora* ssp. *atroseptica* et ceci ne s'est produit qu'à une occasion sur trois (tableau 3).

Seulement une souche d'*E. carotovora* ssp. *atroseptica* sur les six souches utilisées, a été identifiée comme telle à au moins deux reprises avec le système Biolog. Les autres souches ont été identifiées comme *E. carotovora* ssp. *carotovora*, et dans certains cas, le système ne permettait pas de déterminer de quelle sous-espèce il s'agissait (tableau 3).

Le système API 20E a fourni trois principaux codes (1207373, 1207173 et 1205173) pour 40 des 54 essais effectués avec les souches d'*E. carotovora* ssp. *carotovora*. L'un des trois principaux codes a été associé à au moins deux reprises pour 14 des 18 souches d'*E. carotovora* ssp. *carotovora*. Un seul code API 20E

Tableau 3. Identification des souches d'*Erwinia* par caractérisation physiologique et par les systèmes API 20E et Biolog version 3.0

Identification par des tests physiologiques	API 20E		Biolog	
	code	fréquence ^a	identification ^b	fréquence ^c
<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	1207373	16/54	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	45/54
	1207173	15/54	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>atroseptica</i>	3/54
	1205173	9/54	<i>Erwinia</i> sp.	2/54
	1205363	3/54	<i>Enterobacter agglomerans</i>	1/54
	1205373	2/54	Aucune identification	3/54
	1245773	2/54		
	1007173	2/54		
	1207573	1/54		
	1207333	1/54		
	1205573	1/54		
	1245173	1/54		
	1005173	1/54		
	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>atroseptica</i>	1205173	17/18	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>
1207173		1/18	<i>Erwinia</i> sp.	6/18
			<i>E. carotovora</i> ssp. <i>atroseptica</i>	3/18

^a Nombre de fois que le code a été obtenu/nombre de tests réalisés avec les souches d'une même espèce.

^b Le système identifie une souche à l'espèce lorsque le taux de similarité est supérieur à 50%.

^c Nombre de fois que l'identification a été obtenue/nombre de tests réalisés avec les souches d'une même espèce.

(1205173) a été associé aux souches d'*E. carotovora* ssp. *atroseptica*. Ce code a été rarement associé à l'*E. carotovora* ssp. *carotovora* (tableau 3).

Electrophorèse des protéines sécrétées par les souches d'*Erwinia*

Tout comme pour les *Pseudomonas*, de nombreuses protéines sont sécrétées à l'extérieur des cellules lorsque les souches d'*Erwinia carotovora* croissent dans le milieu minimal M9. La présence de 8 à 22 protéines a été révélée par une coloration au nitrate d'argent. Les patrons électrophorétiques variaient fortement entre les souches (fig. 2).

DISCUSSION

La classification des *Pseudomonas* fluorescents est toujours controversée. Dans la dernière édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Palleroni 1984), ces bactéries sont divisées en deux groupes selon leur production d'arginine déshydrolase. Parmi les bactéries productrices d'arginine déshydrolase, on compte cinq espèces, dont le

P. fluorescens. L'espèce *P. fluorescens* se divise en cinq biovars. Les bactéries communément appelées *P. marginalis* par les phytopathologistes appartiennent en fait au biovar II du *P. fluorescens*. Toutefois, dans ce travail, nous référerons à ces bactéries sous le nom de *P. marginalis*. Parmi les espèces ne produisant pas d'arginine déshydrolase, nous comptons trois espèces dont le *P. syringae* et le *P. viridiflava*.

Aucune des techniques utilisées n'est un outil de diagnostic parfait. Même les tests classiques de caractérisation physiologique peuvent s'avérer imparfaits. Par exemple, la souche 115, qui a été identifiée comme *P. fluorescens* par cette méthode, semble plutôt appartenir à l'espèce *P. marginalis* si l'on se fie à toutes les autres méthodes d'identification. De même, la souche 114 de *P. marginalis* devrait être classée comme *P. fluorescens* selon les autres méthodes d'identification.

Les souches de *P. marginalis* semblent former une population relativement homogène. Le système d'identification de Biolog permet de reconnaître la

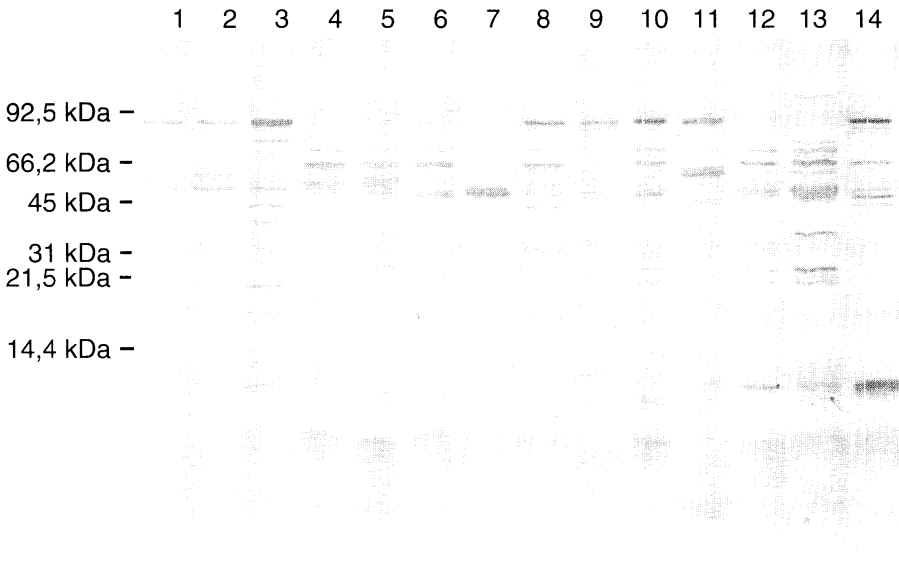


Figure 2. Électrophorèse des protéines sécrétées par des souches d'*Erwinia* causant la pourriture molle. *E. carotovora* ssp. *atroseptica*: puits 1-3, souches 159, 157 et 22, respectivement; *E. carotovora* ssp. *carotovora*: puits 4-14, souches 169, 166, 182, 172, 163, 162, 153, 133, 130, 74 et 13, respectivement. Les chiffres à gauche de la figure sont des indicateurs de masse moléculaire.

majorité des souches de cette espèce. De plus, trois codes API NFT (1557555, 1757555 et 1557455), ne différant entre eux qu'à une ou deux positions, étaient associés aux souches de *P. marginalis*. Toutes les souches de *P. marginalis* se caractérisent aussi par la présence, dans leur profil protéique, d'une quantité importante de trois protéines de 67, 51 et 16 kDa. La proximité taxonomique entre le *P. marginalis* et le *P. fluorescens* est confirmée par l'analyse des profils des protéines sécrétées. Tout comme pour le *P. marginalis* et contrairement au *P. syringae* et au *P. viridiflava*, des quantités importantes de protéines de 67 kDa ou de 51 kDa (ou de ces deux protéines) sont sécrétées par toutes les souches de *P. fluorescens*.

En dépit de la proximité taxonomique entre le *P. viridiflava* et le *P. syringae*, les souches de ces espèces peuvent être différenciées par le système API NFT. En effet, bien que les codes API NFT associés aux deux espèces se ressemblent beaucoup, le troisième chiffre du code est toujours le 7 pour les souches de *P. syringae*, alors qu'il est le 4 ou le 5 pour les souches de *P. viridiflava*. Le système Biolog ne permet pas d'identifier le *P. syringae*, bien qu'il reconnaisse le *P. viridiflava* pour 10 des 12 tests réalisés (83 %). Jones *et al.* (1993) obtiennent un résultat différent pour le *P. syringae* puisque 100 % des souches de cette espèce furent identifiées avec précision avec le système Biolog. Cependant, les résultats de Jones *et al.* (1993) pour l'identification de *P. viridiflava* sont similaires à ceux de notre étude, puisque 87 % des souches de cette espèce sont reconnues avec le système Biolog.

La variabilité observée entre les souches de *P. fluorescens*, qui a conduit à la division de l'espèce en de nombreux biovars, s'observe également dans la population des souches responsables de la pourriture molle. Les nombreux codes API NFT, associés aux souches de *P. fluorescens* étudiées dans ce travail, et l'hétérogénéité des identifications fournies par le système Biolog pour les souches de *P. fluorescens*, montrent bien la variabilité importante des souches de cette espèce. L'hétérogénéité observée dans ce groupe de bactéries rend donc difficile l'emploi

des systèmes miniaturisés comme outil de diagnostic. Cependant, nos résultats d'identification de *P. fluorescens* avec le système Biolog diffèrent de ceux d'autres études. En effet, Jones *et al.* (1993) et Klingler *et al.* (1992) rapportent que le *P. fluorescens* fut identifié avec précision dans 100 % des cas avec le système Biolog.

L'électrophorèse des protéines sécrétées apparaît la technique la plus fiable pour différencier le *P. fluorescens* du *P. marginalis*. Trois protéines de 67, 51 et 16 kDa sont associées au *P. marginalis* alors que seules les protéines de 67 et 51 kDa étaient retrouvées dans le surnageant des souches de *P. fluorescens*. Quant aux souches de *P. viridiflava* et de *P. syringae*, elles semblent se caractériser par l'absence des protéines de 67 et 51 kDa. Une analyse d'un nombre plus élevé de souches de *Pseudomonas* serait toutefois nécessaire pour confirmer l'utilité de l'électrophorèse des protéines sécrétées comme outil d'identification des *Pseudomonas*.

Les systèmes miniaturisés d'identification (API 20E et Biolog) se montrent très efficaces pour reconnaître l'*E. carotovora* ssp. *carotovora*. Avec le système Biolog, nous avons toutefois certaines difficultés à reconnaître les souches d'*E. carotovora* ssp. *atroseptica*. Tout comme Jones *et al.* (1993), nos résultats permettent d'identifier avec précision l'*E. carotovora* sans toutefois différencier les sous-espèces. Le système API 20E attribue un code unique à l'*E. carotovora* ssp. *atroseptica*. Ce code est parfois rencontré avec l'*E. carotovora* ssp. *carotovora*. Dans une étude antérieure, Mergaert *et al.* (1984) avaient associé cinq codes API 20E différents aux souches d'*E. carotovora* ssp. *carotovora*. Ces codes ont été associés pour 25 des 54 tests réalisés avec les souches d'*E. carotovora* ssp. *carotovora* isolées au Québec.

Plusieurs protéines sont sécrétées par les souches d'*E. carotovora*; toutefois, trop de variations sont observées dans les patrons protéiques pour que ces derniers soient utiles à des fins de diagnostic. La détection de protéines cellulaires spécifiques, telles les pectinases, cellulases, protéases, etc., pourrait éventuellement permettre de reconnaître les deux sous-espèces. Dans un travail récent, la

production de pectinases par l'*E. chrysanthemi* a été détectée in planta (Beaulieu *et al.* 1993). Latechnique consiste à récupérer les fluides des tissus macérés et à y séparer les différentes pectinases par électrofocalisation. Il serait maintenant intéressant de déterminer si une technique aussi simple pourrait être adoptée pour des fins de diagnostic.

REMERCIEMENTS

Nous remercions C. Goyer pour ses commentaires sur le manuscrit, P.D. Hildebrand et J.F. Chauveau pour le don de souches bactériennes, et B. Drouin pour son aide dans le montage des figures.

RÉFÉRENCES

- Beaulieu, C., M. Boccara et F. Van Gijsegem. 1993.** Pathogenic behavior of pectinase-defective *Erwinia chrysanthemi* mutants on different plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 197-202.
- Boccara, M., R. Vedel, D. Lalo, M.-H. Lebrun et J.F. Lafay. 1991.** Genetic diversity and host range in strains of *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 293-299.
- Cappellini, R.A., M.J. Ceponis et G.W. Lightner. 1987.** Disorders in celery and carrot shipments to the New York market, 1972-1985. *Plant Dis.* 71: 1054-1057.
- Ceponis, M.J., R.A. Cappellini et G.W. Lightner. 1985.** Disorders in crisphead lettuce shipments to the New York market, 1972-1984. *Plant Dis.* 69: 1016-1020.
- Darrasse, A., S. Priou, A. Kotoujansky et Y. Bertheau. 1994.** PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1437-1443.
- Dickey, R.S. et A. Kelman. 1988.** *Erwinia*. Pages 44-59 in N.W. Schaad (éd.), *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Dickey, R.S., C.H. Zumoff et J.K. Uyemoto. 1984.** *Erwinia chrysanthemi*: serological relationships among strains from several hosts. *Phytopathology* 74: 1388-1394.
- Gitaitis, R.D., R.E. Baird, R.W. Beaver, D.R. Sumner, J.D. Gay et D.A. Smittle. 1991.** Bacterial blight of sweet onion caused by *Pseudomonas viridiflava* in Vidalia, Georgia. *Plant Dis.* 75: 1180-1182.
- Hames, B.D. 1990.** Analysis of gels following electrophoresis. Pages 51-96 in B.D. Hames et D. Rickwood (réds.), *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*. IRL Press, New York.
- Hildebrand, D.C. 1971.** Pectate and pectin gels for differentiation of *Pseudomonas* sp. and other bacterial plant pathogens. *Phytopathology* 61: 1430-1436.
- Hildebrand, P.D. 1989.** Surfactant-like characteristics and identity of bacteria associated with broccoli head rot in Atlantic Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 11: 205-214.
- Jones, J.B., A.R. Chase et G.K. Harris. 1993.** Evaluation of the Biolog GN MicroPlate system for identification of some plant-pathogenic bacteria. *Plant Dis.* 77: 553-558.
- King, E.O., M.K. Ward et D.E. Raney. 1954.** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.
- Klingler, J.M., R.P. Stowe, D.C. Obenhuber, T.O. Groves, S.K. Mishra et D.L. Pierson. 1992.** Evaluation of the Biolog automated microbial identification system. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2089-2092.
- Laemmli, U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* 227: 680-686.
- Lelliott, R.A., E. Billing et A.C. Hayward. 1966.** A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. Appl. Bacteriol.* 29: 470-489.
- Liao, C.H. et J.M. Wells. 1987a.** Association of pectolytic strains of *Xanthomonas campestris* with soft rots of fruits and vegetable at retail markets. *Phytopathology* 77: 418-422.
- Liao, C.H. et J.M. Wells. 1987b.** Diversity of pectolytic, fluorescent pseudomonads causing soft rots of fresh vegetables at produce markets. *Phytopathology* 77: 673-677.
- Lund, B.M. 1983.** Bacterial spoliage. Pages 219-257 in C. Dennis (éd.), *Post-harvest pathology of fruits and vegetables*. Acad. Press, Londres.
- Maniatis, T., E.F. Fritstsh et J. Sambrook. 1982.** *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
- Mergaert, J., L. Verdonck, K. Kersters, J. Swings, J.-M. Boeufgras et J. De Ley. 1984.** Numerical taxonomy of *Erwinia* species using API systems. *J. Gen. Microbiol.* 130: 1893-1910.

- Miller, T.D. et M.N. Schroth. 1972.** Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with a selective medium. *Phytopathology* 62: 1175-1182.
- Palleroni, N.J. 1984.** Family I. Pseudomonadaceae Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1917, 555^{AL}. Pages 141-218 in N.R. Krieg and J.G. Holt (éd.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Volume 1. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Paradis, E., C. Goyer, N.C. Hodge, R. Hogue, R.E. Stall et C. Beaulieu. 1994.** Fatty acid and protein profiles of *Streptomyces scabies* strains isolated in Eastern Canada. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 561-564.
- Pieczarka, D.J. et J.W. Lorbeer. 1975.** Microorganisms associated with bottom rot of lettuce grown on organic soil in New York State. *Phytopathology* 65: 16-21.
- Samson, R., F. Poutier, M. Saily et B. Jouan. 1987.** Caractérisation des *Erwinia chrysanthemi* isolées de *Solanum tuberosum* et d'autres plantes-hôtes selon les biovars et sérogroupes. *Bulletin OEPP (Organ. eur. méditerr. prot. plantes)* 17: 11-16.
- Van Zyl, E. et P.L. Steyn. 1990.** Differentiation of phytopathogenic *Pseudomonas* and *Xanthomonas* species and pathovars by numerical taxonomy and protein gel electrophoregrams. *Syst. Appl. Microbiol.* 13: 60-71.
- Ward, L.J. et S.H. De Boer. 1994.** Specific detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* with a digoxigenin-labeled DNA probe. *Phytopathology* 84: 180-186.