

Isolement et identification de l'agent pathogène de la tuberculose de l'olivier au Maroc

BENJAMA A. *

RESUME

L'agent pathogène de la tuberculose de l'olivier au Maroc a été isolé principalement à partir des tumeurs qui sont les sources d'infection, de conservation et de dissémination de la bactérie. Il est identifié par l'étude biochimique en tube en plaque API 50 et le pouvoir pathogène en inoculation homologue (sur son hôte) comme *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* du groupe Ib de Lelliot.

La réaction sur hôte et non hôte n'est pas la même, l'inoculation artificielle de la bactérie à l'olivier est fiable pour la reproduction des symptômes de tuberculose à 100 %.

L'enquête naturelle de la maladie sur une gamme de variétés d'olivier au Domaine expérimental de l'I.N.R.A. de Meknès montre que toutes les variétés ne sont pas atteintes malgré un foyer à tuberculose. Probablement il y a un phénomène de tolérance de leur part, ce qui reste à vérifier expérimentalement.

1. INTRODUCTION

L'olivier (*Olea europea*) existe principalement dans tout le bassin méditerranéen. Au Maroc, la superficie plantée est de 340.000 ha répartie dans tout le pays (Anonyme, 1984) et représentant 47 % du patrimoine arboricole national. La variété population Picholine Marocaine représente 98 % des plantations oléicoles. Cependant, l'olivier est sujet à plusieurs attaques parasitaires d'ordre fongique, tel que le *Cycloconium oleaginum*, d'ordre entomologiques tels que le *Dacus oleae*, *Euphyllura olivina*, *Sessetia olea*, ou d'ordre bactériologiques telle que *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Ce dernier agent pathogène provoque la tuberculose de l'olivier. Elle a été signalée depuis le 3ème siècle avant J.C.

* (INRA - Meknès)

(PYROWOLAKS & WELTZIEN, 1984) mais elle n'a été identifiée qu'au 19^{ème} siècle (SAVASTANO L., 1886).

La tuberculose s'est beaucoup répandue dans divers pays du Bassin méditerranéen (Europe du Sud, Afrique du Nord, Moyen-Orient) et d'Amérique (Californie) (Fig. 1).

Au Maroc, cette maladie était signalée seulement dans la région de Meknès en 1960 (RIEUF, 1960). Elle s'est étendue depuis dans toutes les régions oléicoles du pays (Fig. 2). Devant ce fléau, l'étude de l'agent pathogène s'impose dans le but de l'identifier dans un premier temps et d'enquêter sur les principales variétés atteintes et non atteintes au champ en vue de sélectionner des variétés résistantes d'olivier dans un deuxième temps.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 **Lieu de prospection** : Collection d'olivier, du Domaine Expérimental de Aïn Taoujdate, INRA, Meknès, représentant 120 variétés plantées en 1951 provenant d'Italie, Espagne, Portugal, U.S.A., France et Afrique du Nord.

2.2 Isolement et identification de l'agent pathogène

2.2.1 **Isolement** : Il est réalisé à partir des tumeurs bactériennes fraîches de rameaux d'olivier issues d'oliveraies de Meknès, Béni-Mellal, Marrakech et Fès. L'isolement est réalisé chaque année depuis 1984.

Le milieu utilisé est composé de levure (5 g), Peptone (5 g), Glucose (7 g) et d'Agar (20 g).

2.2.2 Identification du pathogène :

- Fluorescence (F). Utilisation du milieu de KING B, (1954).
- LOPAT : Levane (L) (Levure 3g, Bactopeptone 5g, saccharose 50 g, Agar 20 g / par litre d'eau distillée stérile), oxydase (O) (KOVACS, 1958), Peptine (P), (Pomme de terre), Arginine (A) de THORNLEY (1960), Tabac (T) KLEMENT (1963).
- Utilisation des sucres : Aesculine 1%, Gélatine 4%, Glucose, Inositol, Sorbitol, Mannose (L(+)) Tartrate, DL Lactate, Erythritol. Ces sucres sont utilisés à 1% de solution finale. Le milieu de base utilisé pour ces sucres est celui d'AYERS *et al.* (1919).
- Utilisation des plaques API 50 de l'Institut Pasteur pour 9

Fig. 1 : Distribution actuelle de la tuberculose de l'olivier dans le monde d'après l'étude bibliographique.

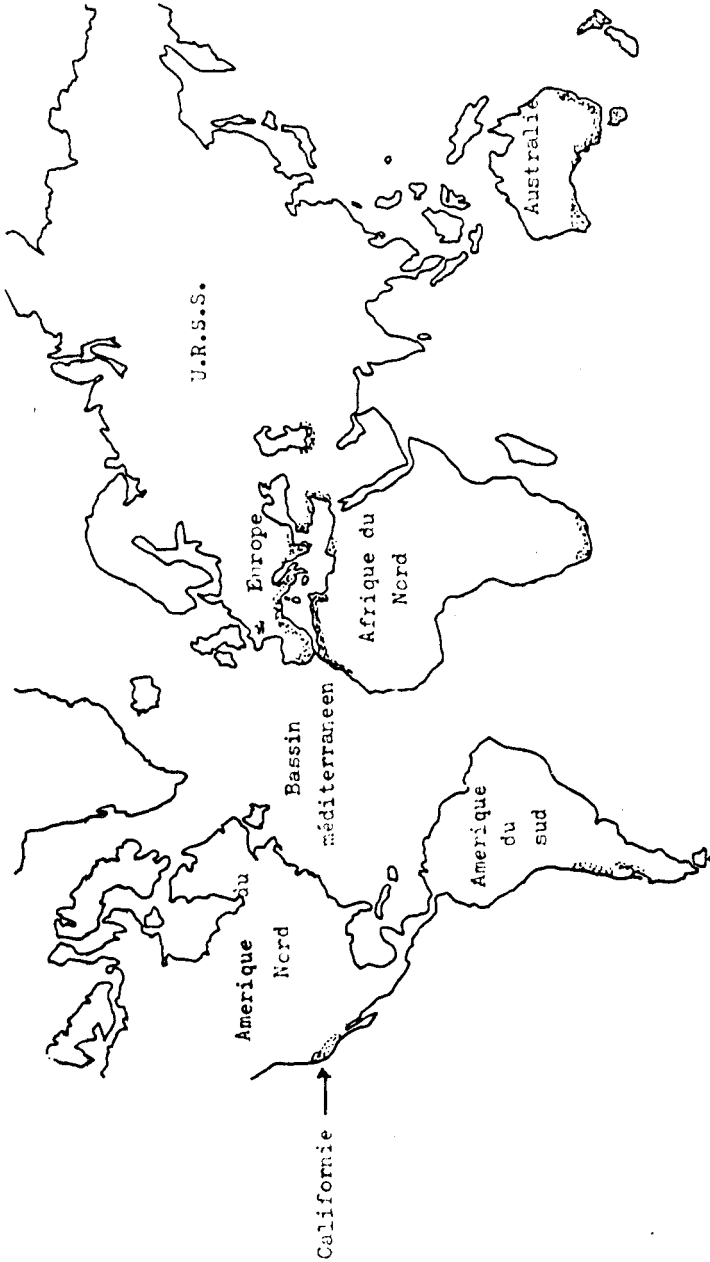
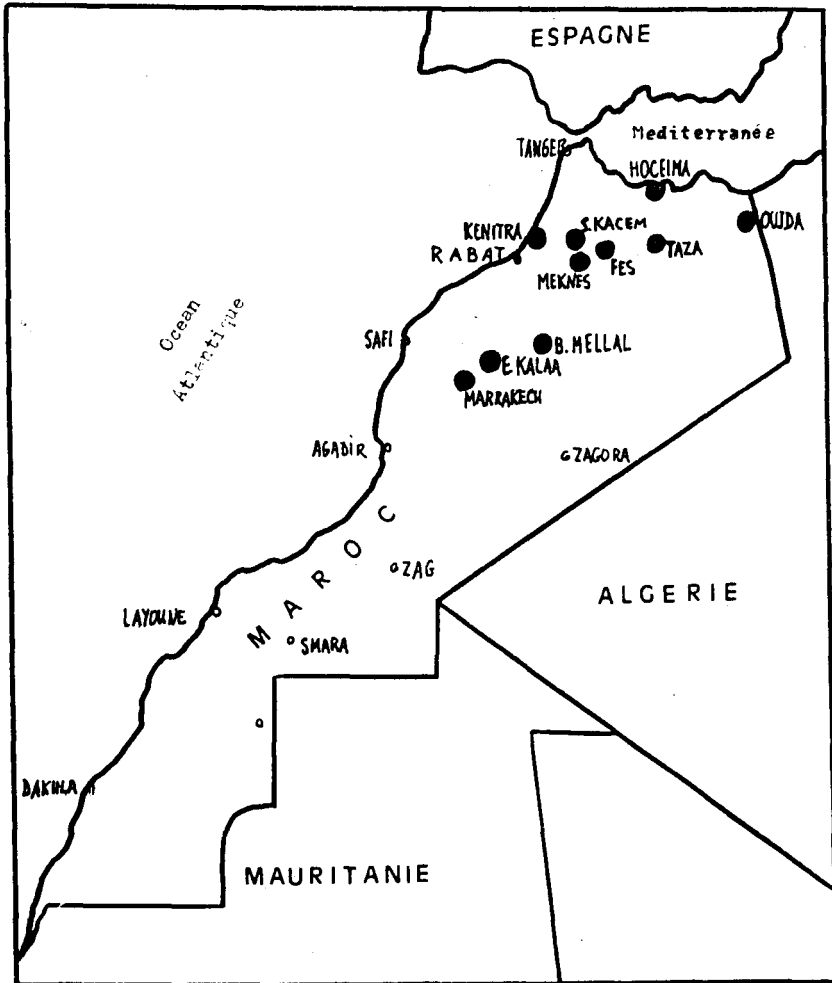


Fig. 2 : Distribution de la tuberculose de l'olivier au Maroc jusqu'en 1986 (Sondage réalisé par le Laboratoire de Phytobactériologie de l'INRA et les Services de la Protection des Végétaux du pays depuis 1984).

(• Présence de la maladie).



Echelle : 1/10 000 000

souches de *Ps. syringae* pv. *savastanoi*, isolées au Maroc, 1 souche isolée en Algérie (K23-15) et une souche témoin (1392 = *Pseudomonas syringae* type).

2.3 Inoculation de la plante hôte (*Olea europea* L.) et une plante indicatrice (*Datura stramonium* L.).

La variété d'olivier "*Meslala*" âgée de 2 ans est utilisée pour le test du pouvoir pathogène des souches isolées. Une blessure au scalpel est réalisée sur l'écorce du rameau de l'olivier et du coton imbibé de suspension bactérienne de 10,8 bactéries/ml est appliqué contre la blessure. Le tout est entouré d'un morceau de parafilm qu'on enlève au bout de 3 jours. Les observations sont réalisées durant 60 jours.

Le *D. Stramonium*, communément appelé stramoine est utilisé comme plante indicatrice à 2 feuilles vraies. Une goutte de suspension bactérienne de 108 bactéries / ml est déposée sur une blessure faite sur la tige. L'observation s'effectue au bout d'une semaine à 2 semaines selon les souches.

3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Notation de la maladie dans la collection du Domaine Expérimental de l'I.N.R.A. (Ain Taoujdate)

Ce qui est important à noter c'est que toutes ces variétés existent dans une seule localité. La variété «*Meslala*» est la seule atteinte à 100 %. Elle constitue le foyer primaire d'infection. Les autres variétés indemnes peuvent donc présenter une certaine résistance à la maladie en conditions naturelles ce qui est à vérifier expérimentalement. Il y a lieu de signaler que la variété qu'on appelle «*Gordale de Ain Taoujdate*» est en cours d'indentification.

3.2. Isolement et identification de l'agent pathogène

L'isolement a été pratiqué sur rameaux, nœuds, feuilles, fruits et tumeurs. Il s'est avéré que seules les tumeurs hébergent l'agent pathogène. Ce dernier existe à l'intérieur de la tumeur, en jonction avec le rameau et à la surface des tumeurs. La tumeur est donc la

principale source d'inoculum, de dissémination et de conservation de la bactérie. Cette dernière a été isolée de la tumeur même pendant les périodes sèches (Température aux alentours de 37° — 40°).

L'agent pathogène identifié répond aux caractères primaires du LOPAT (L+/-, O-, P-, A-, T+) et fait partie des *Pseudomonas* du groupe IB de LELLIOT et al. (1966).

L'étude biochimiques des 70 souches pathogènes isolées est conforme aux caractères de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Cependant, la réponse au Levane et à l'Inositol est variable et 60 % des souches sont Levane négatif et Inositol positif (Tableau 2). Ceci montre que biochimiquement la population de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* isolée d'olivier au Maroc est une population qui n'est pas homogène.

L'identification biochimique des souches par l'utilisation des plaques API 50 de l'Institut Pasteur est plus précise et plus tranchante vu le nombre de sucres mis en compétition (tableau 3), mais elle a l'inconvénient d'être plus coûteuse que le test classique. Les souches répondent aux caractères de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*.

3.3. Pouvoir pathogène des *Pseudomonas syringae* pv. *Savastanoi*

Une collection locale et étrangère de souches de l'agent pathogène est utilisée dans ce test. Il ressort du tableau 4 que toutes les souches sont pathogènes sur plantes hétérologues (tabac et *Datura*) et homologue (olivier) à des degrés différents. Les souches bactériennes de l'olivier manifestent des symptômes plus importants sur leur hôte que les souches du laurier rose (LR) ou troène (T). Le stramoine manifeste des symptômes importants aussi bien avec les souches d'olivier, laurier rose, troène qu'avec les souches de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* et *syringae* utilisées comme témoins, ce qui veut dire que le stramoine ne peut être utilisé comme plante discriminatoire et indicatrice de l'agent pathogène de la tuberculose de l'olivier.

Seul l'olivier reste un hôte valable pour le test du pouvoir pathogène des souches de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* agent de la tuberculose.

Tableau 1: Observation de la tuberculose sur différents géotypes de la collection d'olivier de l'INRA de Meknès (1984 à 1986)

Variétés indemnes	origine +
Ascolana (DAVIS)	Italie
Ascolana (DURF)	Italie
Asoli (ERCOLI)	Italie
Cucco (ERCOLI)	Italie
San Agostino (ULIVA)	Italie
Sevillane longue (MENACER)	Espagne
Mission (DAVIS)	U.S.A.
Zitoun (LEMANISSIER)	Maroc
Santa Catherine (ULIVA)	Italie
Ascolana (MENAGER)	Italie
Ascolana Lencie (Uliva)	Italie
Hispanico	Espagne
San Francesco	Italie
Sevillane ronde (MENAGER)	Espagne
Gordale (Martin)	Espagne
Grossadi Spagna (ERCOLI)	Italie
Villalouga (Espagne)	Espagne
Manzanilla (DAVIS)	Espagne
Tranche	France
Sigoise -- St Devie	Algérie
Zerhoun	Maroc
Gordale de Ain Taoujdate	Espagne
Aghenfas	Afrique du N.
Gros ribier	France
Gailletier	France
Redding Picholine (DAVIS)	USA
Zarazi	Tunisie
Aguenau	Afrique du N.
Bouriche	Afrique du N.
Carrasquenda	Portugal

VARIETES ATTEINTES*

Variétés	Origine +	Variétés	Origine +
Alfataranca**	Grèce	Corregiolo	Italie
Cornicabra**	Espagne	Pigual	Espagne
Laucocarpa	Italie	Mignola	Italie
Carboncella**	Italie	Teshie	Italie
Oblanza**	Grèce	Aracémo	Italie
Nostrale	Italie	Moraillo	Italie
Lonctanis	Italie	Marinello	Italie
Leccie**	Italie	Chiandora	Italie
Tagi ashi	Italie	Verdale	Espagne
Oglionola	Italie	Picholotana	Italie
Castelana	Espagne	Redendil	Portugal
Dritta	Italie	Carmilitana	Italie
Marsolina	Tunisie	Lavagnia	Italie
Changelot	Espagne	Americana	Italie
Serra	Portugal	Della-Madone	Italie
Serranos	Portugal	Cordovil	Portugal
Rollondello	Espagne	Madural	Portugal
Barou	Tunisie	Agropolo gali	Italie
Marcelli	Italie	Galigagrada	Portugal
Vernina	Italie	Meslala	Maroc
Blanquetus	Espagne	Bouchouk	Algérie
Carino	Inconnue	Azeradj	Algérie
Frantoie	Italie	Ronde de Ménara	Maroc
Olivière	France		
Amallaou	Afrique du N.		
Coratino	Italie		
Mavrini	Portugal		
Roma pendula	Italie.		
Grossa de Sicilia	Italie		
Dulci del Moroco	Italie		
Blanquette	Espagne		

* = Par ordre croissant de degré d'attaque par la maladie

** = Variétés qui étaient indemnes en 1984

+ = Les noms de variétés et leurs origines ont été recueillies des listes officielles du Domaine Expérimental de l'I.N.R.A. (Meknès)

= en cours d'identification

(1) à 10 tumeurs / arbre

(2) entre 10 et 90 tumeurs / arbre

(3) à 100 tumeurs / arbre

Tableau 2 : Caractérisation biochimique de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* isolés de l'olivier au Maroc.

Tests utilisés	Nombre de souches (70) en pourcentage			
	60 %	33 %	4 %	03 %
Tabac (plante)	+	+	+	+
Lavane	—	—	+	+
Inositol	+	—	—	+
Fluorescence	+	+	+	+
Oxydase	—	—	—	—
Pectine	—	—	—	—
Arginine	—	—	—	—
Aesculine	—	—	—	—
DL lactate	—	—	—	—
Glucose	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+
L(+) Tartrate	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+

Pseudomonas syringae pv. *savastanoi* Ib de Lelliot

+ = Positive
— = Négative

Tableau 3 : Caractères biochimiques en plaqué API 50 des souches de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* isolées au Maroc.

source de carbone	souches bactériennes	67-27	87.30	66.7	67.74	67.68	66.57	67.77	87.6	73.29	K 23.15	1392
0. Control												
1. Glycerol		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2. Erythritol												
3. D. Arabinose												
4. L. Arabinose		+	+	+	+	+	+	+			+	+
5. Ribose												
6. D. Xylose												
7. L. Xylose												
8. Adonitol												
9. B. Methyl-xyloside												
10. Calactose		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11. D. Clucose		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12. D. Fructose		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13. D. Mannose		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14. L. Sorbose												
15. Rhamnose												
16. Dulcitol												
17. Inositol		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18. Mannitol		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19. Sorbitol		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20. A. Methyl D. mannoside												
21. A. Methyl D. Glucoside												
22. N Acetyl glucosamine												
23. Amygdaline												
24. Arbutine												
25. Esculine												
26. Salicine												+
27. Cellobiose												+
28. Maltose												
29. Lactose												
30. Melibiose												
31. Saccharose												
32. Trahalose												
33. Inuline												
34. Melzitose												
35. D. Raffinose												
36. Amidon												
37. Glycogène												
38. Xylitol												
39. B. Gentiobiose												
40. D. Turanose												
41. D. Lyxose												
42. D. Tagatose												
43. D. Fucose												
44. L. Fucose												
45. D. Arabitol		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
46. L. Arabitol												
47. Cluconate												
48. Ceto.gluconate		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
49. Ceto.gluconate		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Le blanc signifie que la réaction est négative

Tableau 4: Pouvoir pathogène de *Ps. syringae* pv. *savastanoi* sur tabac, *Datura*, olivier,

Pays d'origine	Plante hôte	Souches N°	Tabac	<i>Datura</i>	Olivier
Maroc	Olivier (ol)	66-7	+	+++	+++
Maroc	Olivier	66-57	+	+++	+
Maroc	Olivier	66-27	+	+++	+++
Maroc	Olivier	67-74	+	+++	++
Maroc	Olivier	66-77	+	+++	+++
Maroc	Olivier	87-6	+	++	++
Maroc	Olivier	87-30	+	+++	+++
Maroc	Olivier	73-29	+	+	++
Maroc	Olivier	67-68	+	+++	+++
Tunisie	Olivier	71	+	+++	+++
Algérie	Laurier rose (LR)	2088		+	+
Grèce	Laurier rose	T 12-5	+	++	+
Italie	Troène (T)	T 35-10	+	+++	++
Italie	Troène	T 37-14	+	+++	-
Algérien	Frêne (F)	2176	+	+++	-
Souches types	Haricot	1390	+	+++	-
témoins	Prumier	1392	+	+++	-

- +++ = Belles tumeurs sur toutes les blessures
 ++ = Tumeur pas sur toutes les blessures
 + = Présence de boursouflures (petites tumeurs)
 - = Pas de réaction

Seule l'Olivier est valable pour le teste du pouvoir pathogène des souches de *Ps. syringae* pv. *savastanoi* en réaction homologue en conditions contrôlées. Il est évident que le degré de sensibilité diffère d'une variété à une autre mais ce qui est certain c'est que toutes les souches pathogènes sont virulentes sur olivier.

4. CONCLUSION

La plupart des variétés qui existent dans la collection du Domaine Expérimental de Ain Taoujdade, de l'I.N.R.A. de Meknès ne sont pas contaminées malgré la présence d'un foyer à tuberculose sur la variété «Meslala». Ceci montre que ces variétés sont peut être tolérantes à la maladie, ce qui reste à confirmer par inoculation expérimentale.

La population bactérienne de *Ps. syringae* pv. *savastanoi* est hétérogène. L'agent pathogène est localisé surtout sur les tumeurs aussi bien en profondeur qu'en surface. Il est donc préférable d'éviter la récolte manuelle car c'est un moyen efficace de dissémination du parasite sur d'autres rameaux sains.

Seule l'Olivier est valable pour le teste du pouvoir pathogène des souches de *Ps. syringae* pv. *savastanoi* en réaction homologue en conditions contrôlées. Il est évident que le degré de sensibilité diffère d'une variété à une autre mais ce qui est certain c'est que toutes les souches pathogènes sont virulentes sur olivier.

Un travail sur la sensibilité variétale de l'olivier est en cours de réalisation.

BIBLIOGRAPHIE

- Anonyme. 1984. Situation actuelle de l'oléiculture au Maroc par le Ministère de l'Agriculture et de la Réforme Agraire *Olivae*. 3, 18-21
- AYERS S.H. RUPP. P. JOHSON W.T. 1919. Study of the alkali forming bacteria in milk U.S. Depart Agro Bull. 782
- KING E.O. WARD M.K. RANEY D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocynin and fluorescin. *J. of lab. and clin. med* 44.301.307
- KLEMENT Z. 1963. Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic *Pseudomonas*. *Nature*. 199, 299-300
- KOVACS. N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by oxidase reaction. *Nature*. 178-703
- LELLIOT R.A. BILLING E. HAYWARD A.C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas* *J. Applied bacteriol* 29.470-489
- PYROWOLAKIS E. WELTZIEN H.C. 1974. Studies on the distribution of olive Knot induced by *Pseudomonas savastano* (SMITHSTEV) in the Greek of crete. *Phytopathol. Mediterr.* 12-13 (1,2) 118-120 s.
- RIEUF P. TEASCA G. 1970. Parasites et saprophytes des plantes au Maroc. Les cahiers de la recherche agronomique Direction de la recherche agronomique, Rabat, Maroc 9.309.
- SAVASTANO L. 1886. Les maladies de l'olivier et la tuberculose en particulier. *Compt. Ren. Acad. Sci (Paris)*. 103-1278 1281
- THORNLEY M.J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other gram (-) bacteria on the basis of arginine metabolism. *J. Applied bacteriol* 23, 37,52