

INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE ET DU TEMPS D'INCUBATION SUR LA PRODUCTION D'AIA PAR *PSEUDOMONAS SAVASTANOI* PV. *SAVASTANOÏ*

BENJAMA Ah.*, GARDAN L. **

ملخص

تمت في هذه الدراسة مقارنة ثمانية عشرة مجموعة من بكتيريا *Pseudomonas savastanoi* في قدرتها على إفراز كميات الحامض AIA بعد نموها تحت 26 درجة حرارة وفي أوساط غذائية سائلة. أسفرت نتائج قياس هذه الكميات بواسطة جهاز سبيكتروفوتوميتر spectrophotomètre à 530 nm بعد 24، 48، 72 و 96 ساعة من نمو البكتيريا على أن أعلى إنتاج AIA كان بعد 72 ساعة لـل المجموعات وأقل بعد 96 ساعة. كما تشير الدراسة أن مجموعات البكتيريا أكثر قدرة على إصابة شجر الزيتون الذي يفرز كميات أقل من AIA، والعكس صحيح.

* INRA, Lab. phytobactériologie, B.P. 533 Marrakech, MAROC

** INRA, Station de pathologie Végétale 42, G. Morel 49070, Beaucozéd Cedex F Angers, FRANCE.

RESUME

Dix huit souches de *Pseudomonas savastanoï* pv *savastanoï* ont été comparées pour leur production d'Acide Indole Acétique (AIA) sur trois milieux liquides incubés à 26°C. Les quantités d'AIA produites ont été mesurées au spectrophotomètre à 530 nm, après traitement du surnageant au réactif de Salkowski. Ces mesures, relevés à 24, 48, 72 et 96 h, ont montré que la production maximale d'AIA se situe à 72 h. Les quantités d'AIA produites régressent à 96 h. Les souches de *Pseudomonas savastanoï* très agressives sur olivier produisent peu d'AIA et vice-versa.

MOTS CLES : *Pseudomonas savastanoï*, Acide Indole Acétique durée, d'incubation, olivier, température.

SUMMARY

Eighteen strains of *Pseudomonas savastanoï* pv *savastanoï*, which were grown on tree liquid medium at 26°C, have been compared for their AIA production.

The produced quantities of AIA have been measured by spectrophotometer 530 nm after 24, 48, 72 and 96 hours of inocubation. The higher production of AIA were occured at 72 hours for the majority of strains. This quantities decrease at 96 hours.

This study showed that the most aggressive strains of bacteria on olive trees produced lower quantitates of AIA and vice-versa.

INTRODUCTION

La tuberculose est la maladie bactérienne de l'olivier qui est très fréquente dans le bassin méditerranéen et en Californie aux Etats Unis. Les excroissances sur olivier sont connues depuis le temps du philosophe grec Theophratus (300 ans A.J.) (SURICO, 1988). La bactérie a été isolée pour la première fois en Italie par SAVASTANO (1908), décrite par SMITH (1911) et incluse plus tard dans le genre *Pseudomonas* (STEVENS, 1913). Elle a été incluse dans la nomenclature de YOUNG et al., (1978) et a été redénommé récemment par GARDAN et al., (1992) comme *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

Au Maroc, cette bactérie a été isolée et identifiée (BENJAMA, 1989). La maladie est répandue dans toutes les oliveraies du pays et la variété la plus atteinte est la Meslala (BENJAMA, 1988 ; BENJAMA et al., 1992 ; BENJAMA et al., 1993).

La bactérie induit des tumeurs sur l'olivier (*Olea europea* L.) et le Laurier rose (*Nerium oleander* L.). Elle est aussi pathogène sur Frêne (*Fraxinus excelsior* L.), Troëne (*Ligustrum japonicum* Thunb), Jasmin (*Jasminus* spp.), Forsythia (*Forsythia intermedia* Zab) et *Phillyrea* sp. (BRADBURY, 1986).

Peu de publications relatent le mécanisme par lequel la bactérie induit la maladie. Durant ces vingt dernières années, l'accent a été mis sur les gènes impliqués dans la production des dérivés indoliques par *Ps. syr.* pv. *savastanoi* en liaison avec les facteurs intervenant dans l'expression des symptômes.

Les échanges de métabolites entre l'hôte et le pathogène jouent un grand rôle dans les interactions hôte-parasite (MARLOW & KOSUGE, 1972). Comme le pathogène envahit les tissus de l'hôte, il prend les constituants de l'hôte et les utilise comme éléments nutritifs et produit de l'Acide Indole Acétique (MAGIE, 1963 ; WILSON, 1985).

BELTRA (1961) rapporte déjà que les tumeurs contiennent des concentrations élevées d'une substance de croissance et montre que la bactérie l'accumule aussi en milieu de culture contenant le tryptophane. Cette substance est identifiée comme étant l'Acide Indole 3 Acétique (AIA) par MAGIE & WILSON (1962) qui affirment son implication dans le processus de formation de la tumeur. Le L-tryptophane est converti en indol acétamide par tryptophane-2-monooxygénase puis en AIA par une indole acétamide hydrolase (WILSON & MAGIE, 1963 ; KOSUCE *et al.*, 1966). La synthèse de l'AIA est régulée partiellement par le "Feed back inhibition" (MOYED, 1960 ; SOMERVILLE & YANOFSKY, 1965).

En milieu de culture, l'accumulation de l'AIA produit par les souches de *Ps. savast.* pv. *savastanoi* (SMIDT & KOSUGE, 1978 ; SURICO et al., 1984) et de cytokinines (SURICO *et al.*, 1975 ; SURICO *et al.*, 1984) sont impliqués dans la formation des tumeurs de la tuberculose : l'AIA est responsable de la vitesse de multiplication des bactéries et les cytokinines de la croissance en volume des tumeurs.

Ce travail a pour but d'étudier l'influence du milieu de culture et du temps d'incubation sur la production d'AIA par les souches de *Pseudomonas savastanoi* isolées au Maroc comparées avec des souches étrangères.

MATERIEL ET METHODES

Souches utilisées

Tableau I : origine des souches de *Ps. savastanoi*.

plante hôte	pays	numéro de souches
Olivier	Maroc	66-7, 67-27, 66-57, 27-49, 67-74, 73-29, 87-30, 87-6, 67-68.
Olivier	Tunisie	71
Laurier rose	Algérie	2088 *
Laurier rose	France	2084 *, 2092 *
Laurier rose	Grèce	T12.5*
Phyllerea	Algérie	T51.1*
Myrtus	Syrie	U58.1*
Frêne	Pays bas	2174 *
Jasmin	Grèce	1751 *
Autres		2746 * (<i>Agrobacterium</i>). 1392 * (<i>Ps. syringae</i> type)

* CFBP : Collection Française des Bactéries Phytopathogènes

Méthodes utilisées

milieux utilisés : On cultive les souches bactériennes dans trois milieux liquides différents :

* King B (KB) : Proteose peptone 20g, glycérol 10g, K₂HPO₄ 1,5g, MgSO₄ 1,5g par litre eau distillée stérile (KING *et al.*, 1954).

* Levure Peptone Glucose (LPG) : Levure 0,3%, Peptone 0,5% et glucose 0,5%

* Eau Peptonée Nitratée (EPN) : Eau Peptonée Nitratée 0,1%

Dosage de L'AIA : La concentration bactérienne de départ est d'environ 10 ufc (unité formant colonie)/mL.

Les milieux sont mis en agitation continue à 26°C pendant 24, 48, 72 et 96 heures à l'obscurité totale. Trois répétitions sont effectuées pour chaque traitement. Après centrifugation (5000 g pendant 10 mn), on mélange 1,5 mL du surnageant avec 3 mL du réactif de SALKOWSKI (60 mL de H₂SO₄ pur, 100ml d'eau distillée et de 3 ml de FeCl₃ 1,5 M) et on laisse incuber pendant 30 mn.

Ensuite on observe les résultats au spectrophotomètre à 530 mn. La quantité d'AIA en µg/mL a été mesurée par rapport à une gamme étalon établie avec de l'AIA pur. La méthode statistique utilisée est celle de DUNCAN pour la comparaison des moyennes.

Inoculation de jeunes oliviers : des suspensions bactériennes de 5.10³, 5.10⁵, 5.10² et 5.10⁹ b/mL sont inoculées sur six variétés d'olivier âgées de 2 ans avec 3 répétitions par plant. Des blessures des entre-noeuds du rameau sont effectuées au scalpel et un coton imbibé avec la suspension bactérienne sont déposés sur la blessure. Le tout est recouvert avec un papier parafilm pendant 3 jours. Les blessures sont espacées de 10 cm. Le système de notation est basé sur la durée d'apparition des symptômes (pendant 3 mois) et sur l'intensité de la maladie établie selon l'échelle suivante :

0 = pas de symptôme ; 1 = points tumorigènes sur la blessure ; 2 = anneau de tumeur autour de la blessure ; 3 = formation de tumeur sur toute la blessure).

RESULTATS

Influence du milieu de culture dans la production de l'AIA

Un échantillon de souches a été expérimenté sur les 3 milieux liquides et il s'est avéré que seul le milieu de culture à base de King B permet la plus grande production de l'AIA par les souches de *Ps. savastanoi* (tableau II). Le milieu de KB a été donc choisi pour le reste de l'étude.

Tableau II : Production de L'AIA (en µg/mL) suivant le milieu de culture pour quelques souches de *Ps. savst. pv. savastanoi* après 24 heures d'incubation.

souches	KB (R)	LPG (r)	EPN (j)
66.7	0,522	0,383	0,218 r
73.29	0,639	0,414	0,170
U58.1	0,942	0,757	0,205
2088	0,125 r	0,195 j	0,102
71	0,074 j	0,057 j	0,030

R : réaction Rouge
j : réaction jaune
r : réaction rosâtre

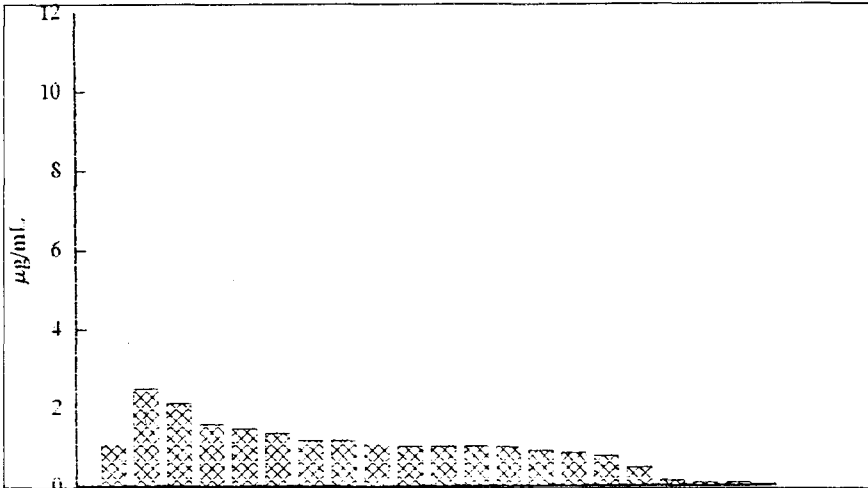
Le tableau III résume les moyennes de trois répétitions des doses d'AIA en $\mu\text{g/mL}$ produites par les différentes souches bactériennes.

Tableau III : Quantité d'AIA ($\mu\text{g/mL}$) produites par les différentes souches de *Pseudomonas* après 24 à 96 heures d'incubation.

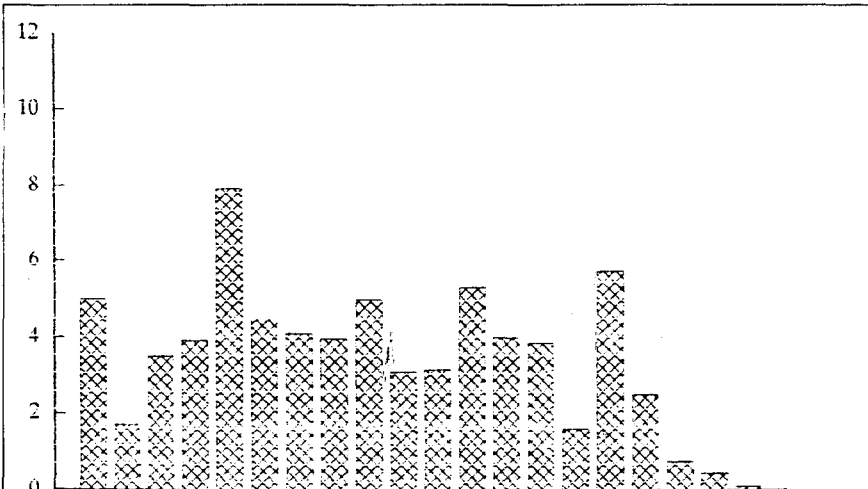
	temps souches	24 h	48 h	72 h	96 h
Classe I	U58.1	1.47	7.9	11.45	7.03
	2084	2.82	6.7	10.45	8.2
	66.7	0.76	5.7	10.13	7.89
	87.6	1.15	4.1	6.95	9.1
	1751	1.16	3.96	6.76	3.48
	67.77	0.88	3.86	5.75	6.83
	1392	1.57	3.91	5.73	4.9
	87.30	0.99	3.99	5.73	8.14
	73.29	1	5.3	5.6	10.2
	66.57	1.35	4.49	5.54	7.17
	67.74	1	3.17	5.37	6.6
67.68	1	3.1	5.34	4.2	
Classe II	2092	2	3.5	4.56	6.75
	T51.2	0.46	2.5	3.87	3.39
	67.27	0.84	1.64	2.72	3.5
Classe III	2088	1.8	3.96	1.71	4.82
	T12.5	2.48	1.72	1.16	0.79
Temoin	2746	0.075	0.09	0.95	1.2
	71	0.11	0.77	0.54	0.73
	2174	0.08	0	0.4	0.12

Après 24 heures d'incubation, la concentration de produits indoliques se situe entre $0,5 \mu\text{g/mL}$ et $3 \mu\text{g/mL}$ selon les souches (Fig. 1a). La souche type de *Ps. syringae* CFBP 1392 produit des quantités importantes ($1,57 \mu\text{g/mL}$) par rapport aux souches de *Ps. savastanoi*.

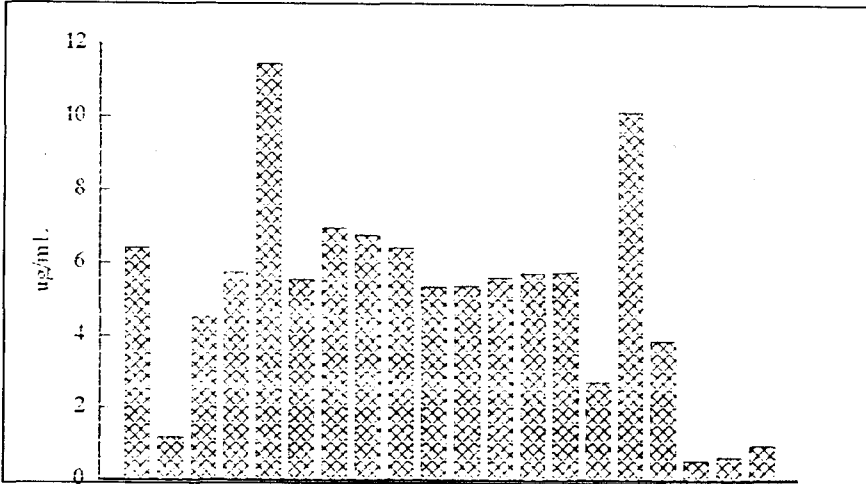
Après 48 heures d'incubation, la synthèse de produits indoliques devient de plus en plus variable entre les souches et a sensiblement augmenté par rapport aux concentrations obtenues à 24 h. La souche type de *Ps. syringae* a produit une concentration de $3,91 \mu\text{g/mL}$. La plus haute concentration en AIA se situe à $7,9 \mu\text{g/mL}$ pour la souche U58.1 (fig. 1b), isolée de *Myrtus* sp.

Fig. 1a : Doses d'AIA de *Ps. savastanoi* à 24 heures 2088

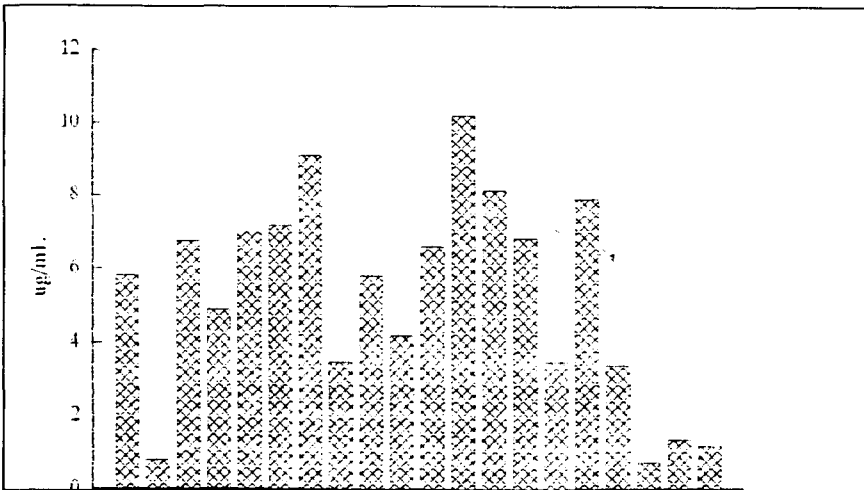
2090 U58.1 87.6 2088 67.74 87.30 67.27 T51.2 2174
 T125 1392 66.57 67.68 73.29 67.77 66.7 71 2746
 souches bactériennes

Fig. 1b : Doses d'AIA de *Ps. savastanoi* à 48 heures 2088

2090 U58.1 87.6 2088 67.74 87.30 67.27 T51.2 2174
 T125 1392 66.57 67.68 73.29 67.77 66.7 71 2746
 souches bactériennes

Fig. 1c : Doses d'AIA de *Ps. savastanoi* à 72 heures 2088

2090 U58.1 87.6 2088 67.74 87.30 67.27 T51.2 2174
 T125 1392 66.57 67.68 73.29 67.77 66.7 71 2746
 souches bactériennes

Fig. 1d : Doses d'AIA de *Ps. savastanoi* à 96 heures 2088

2090 U58.1 87.6 2088 67.74 87.30 67.27 T51.2 2174
 T125 1392 66.57 67.68 73.29 67.77 66.7 71 2746
 souches bactériennes

Fig. 2 a : Analyse statistique à 24 heures par le test de Duncan des doses d'AIA produites par les souches de *Ps. savastanoi*

DOSAOA 24 H

.02	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	2784
.03	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	2174
.04	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	71
.06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	T51.2
.1	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	66.7
.12	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	67.27
.12	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	87.30
.13	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	67.74
.13	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	73.29
.14	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	67.68
.14	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	2088
.14	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	67.68
.15	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	87.6
.15	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1751
.18	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	66.57
.19	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	458.1
.21	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1392
.27	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	2090
.33	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	T12.5
.38	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	2084

(S : signicative. NS : non signicative).

Fig. 2 b : Analyse statistique à 72 heures par le test de Duncan des doses d'AIA produites par les souches de *Ps. savastanoi*

DOSAOA 72 H

.06	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	2746
.08	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	2174
.15	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	71
.16	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	T51.2
.36	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	66.7
.49	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	67.27
.52	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	67.77
.6	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	87.30
.6	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	73.29
.7	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	67.74
.71	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	67.68
.72	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	2088
.73	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	87.6
.73	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1751
.75	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	66.67
.83	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	US8.1
.86	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1392
.91	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	2090
.95	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	T12.5
1.23	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	2084

(S : signicative. NS : non signicative).

Fig. 2 c : Analyse statistique à 45 heures par le test de Duncan des doses d'AIA produites par les souches de *Ps. savastanoi*

DOSAOA45 H

0	NS	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	2746
.02	NS	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	2174
.11	NS	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	71
.14	NS	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	T51.2
.23	NS	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	66.7
.29	NS	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	67.27
.34	NS	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	67.77
.42	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	87.30
.47	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	73.29
.42	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	67.74
.51	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	67.74
.52	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	2088
.52	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	67.68
.53	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1751
.54	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	87.6
.59	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	68.57
.65	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	U.52.1
.67	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	2080
.67	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1392
.88	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	T12.5
.95	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	2084

(S : signicative. NS : non signicative).

Fig. 2 d : Analyse statistique à 96 heures par le test de Duncan des doses d'AIA produites par les souches de *Ps. savastanoi*

.06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	2746			
.1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NS	S	S	NS	NS	2174	
.1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NS	S	S	NS	NS	71	
.14	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	T51.2			
.25	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	66.7	
.46	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	67.27	
.46	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	67.77	
.55	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	87.30	
.55	S	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	73.29	
.62	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	67.74	
.88	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	67.68	
.89	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	2088	
.59	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1751	
.93	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	87.5	
.94	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	68.57	
1.08	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	U.58.2	
1.11	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1392	
1.15	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	T12.5	
1.15	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	2089	
1.22	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	2084

(S : signicative. NS : non signicative)

Après 72 heures d'incubation, on remarque une stabilisation de la synthèse de produits indoliques. La plus haute concentration se situe à 11,45 µg/mL pour la souche U58.1, suivie de 10,45 µg/mL avec la souche 2084 et de 10,18 µg/mL avec la souche 66.7. Pour les autres souches il y a une stabilisation entre les valeurs de 4 µg/mL et 7 µg/mL.

La souche type de *Ps. syringae* induit la synthèse d'AIA à une concentration de 5,73 µg/mL, et donc se situe aussi dans la fourchette des doses de la plupart des souches de *Ps. savastanoi* (fig. 1c).

Après 96 heures d'incubation, on constate une régression de la synthèse de ces produits indoliques pour la plupart des souches de *Ps. savastanoi* y compris la souche type de *Ps. syringae* alors qu'il y a toujours synthèse des indoles par les souches isolées au Maroc (fig. 1d).

La souche d'*Agrobacterium* (2746) testée à titre comparatif a une production négligeable et est considérée comme témoin négatif.

Il faut noter que la souche tunisienne (71) de *Ps. savastanoi* d'olivier, et celle hollandaise de frêne (2174) n'ont pas produit d'indoles quelques soit le temps d'incubation.

L'analyse statistique des données a montré qu'à 24h., il y a une différence hautement significative (à 1%) entre les souches (fig. 2a) qui diminue sensiblement à 48h. (fig. 2b). A 72 h., cette différence n'est plus significative (fig. 2c), ce qui démontre qu'il n'y a pas de différence entre les concentrations. Autrement dit, l'optimum de synthèse de l'AIA pour la plupart des souches se situent plutôt à 72 h. d'incubation qu'à 48 h.

On peut donc considérer 3 classes de souches : la classe I avec une forte production d'AIA, la classe II avec une production moyenne et la classe III avec une faible production (tableau III). Le seuil à partir duquel les souches commencent à produire de l'AIA est de 3 µg/mL. Les souches 71, 2174 et 2746 sont considérées comme témoins négatifs (couleur jaune).

DISCUSSIONS

La synthèse de l'AIA est déjà mesurable après 24 heures d'incubation mais d'une manière très variable entre les différentes souches de *Pseudomonas savastanoi*. La concentration des produits indoliques augmente à 48 h. pour se stabiliser à 72 h. et diminuer à 96 h. Cette quantité de produits synthétisés varie d'une souche à l'autre.

Un autre fait marquant, c'est que la souche type de *Ps. syringae* produit aussi de l'AIA en quantité suffisamment comparable à celle de *Ps. savastanoi*, ceci a été confirmé par Fett *et al.* (1987) pour d'autres souches de *Ps. syr. pv syringae*.

Le test du pouvoir pathogène des souches marocaines a montré que la 87.6, 67.77 et 66.57 sont plus agressives sur 6 variétés (*Frantoio, Ascolana dura, Manzanille, Dahbia et gordale*) que la 67.27, 67.74 et 74.29 (BENJAMA, sous

presse). Ces souches produisent des produits indoliques d'une façon variable. La souche 66.7 a une agressivité plus faible quelque soit la variété. Elle est peu pathogène et possède une synthèse d'AIA élevée par rapport aux autres souches isolées au Maroc et réputées très pathogènes. Par contre la souche 71 non pathogène induit une synthèse nulle. Ceci laisse supposer que la pathogénicité des souches de *Ps. savastanoi* n'est pas liée à la quantité d'AIA synthétisée mais plutôt à des facteurs génétiques inhérents à la souche bactérienne. MILLER (1961), THIMANN (1963) et TORREY (1950) supposent que des cytokinines sont impliquées en même temps que l'AIA dans la prolifération des tumeurs.

La synthèse d'AIA n'est qu'un processus du métabolisme du tryptophane permettant la mise en place d'une niche écologique favorable à la multiplication des bactéries et leur prolifération et à la désorganisation du métabolisme biochimique des cellules végétales.

Le volume d'une tumeur n'est pas forcément lié à la quantité d'AIA produite par la souche pathogène en question.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BELTRA R., 1961. Efecto morfogenetico observado en los extractos hormonals de los tumores del olivo. *Microbiol. Espagnola*, 14, 177-187.
- BENJAMA Ah., 1988. Parasitic olive diseases in Morocco. *Olivae*, 20, 29-33.
- BENJAMA Ah., 1989. Isolement et identification de l'agent pathogene de la tuberculose de l'olivier au Maroc. *El Awamia*, 72, 57-69.
- BENJAMA Ah, WALALI L., JANATI L. & MOUKHLI A., 1992. Field reaction of different varieties of olive (*Olea europea* L.) to olive knot disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (E.F. Smith) Stevens. 3rd Int. Working Group on *Pseudomonas syringae* pathovars. Lisbon Portugal (1987). *El Awamia*, 75; 41-52.
- BENJAMA Ah., ATBI M., TAHIRI H.J. & AZNADI A., 1993. Situation actuelle de la tuberculose de l'olivier dans la région de Zerhoun au Maroc. *El Awamia*, 83, 153-160.
- BRADBURY J.F. , 1986. Guide to the Plant Pathogenic Bacteria. Kew : CAB Int. Mycol. Inst. 332pp.
- FETT WF, OSMAN S.F., and DUNN M.F., 1987. Auxin production by plant pathogenic Pseudomonads and Xanthomonads. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 1839-1845.
- GARDAN L., DAVID C., MOREL M., GLICKMANN E., ABU-GHORRAH M., PETIT A. and DESSAUX Y., 1992. Evidence for a correlation between auxin production and host plant species among strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *Appl. environm. Microbiol.*, 58, 1780-1783.
- KING E.D., WARD M.K & RANEY D.E., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Medec.*, 44, 301-307.
- KOSUGE T., HESKETT M.G. & WILSON E.E. 1966. Microbial synthesis and degradation of Indol-3-Acetic Acid. I-The conversion of L-tryptophan to indole 3-acetamide by an enzyme system from *Pseudomonas savastanoi*. *J. Bio. Chem.*, 241, 3738-3744.
- MAGIE A.R., 1963. Physiological factors involved in tumor production by the oleander knot pathogen, *Pseudomonas savastanoi*. Ph. D. Thesis, Univ. California, Davis, 104pp.
- MAGIE A.R. & WILSON E.E., 1962. Expressions of virulence among isolates of *Pseudomonas savastanoi* from olive and oleander. *Proc. Amer. Phytopathol. Soc. Phytopathology.*, 52, 741 (Abst).
- MARLOW J.L.; & KOSUGE T., 1972. Tryptophan and indolacetic acid transport in the olive and oleander knot organism *Pseudomonas savastanoi* (E.F. Smith) Stevens. *J. gen. Microbiol.*, 72, 211-219.
- MILLER C.O., 1961. Kinetin and related compounds in plants growth. *Annu.*

Rev. Plant Physiol., 12, 395-408.

MOYED H.S., 1960. False feedback inhibition of tryptophan biosynthesis by 5-methyl-tryptophan. J. Biochemistry, 235, 1098-98-1102.

SAVASTANO L., 1908. Sulla transmissibilita del bacillo della tubercolosi dell'olivo nell'oleandro. Bol. Arb. Ital., 4, 86-87.

SMIDT M. & KOSUGE T., 1978. The role of Indol-3-Acetic accumulation by alpha methyl tryptophan resistant mutants of *Pseudomonas savastanoi* in gall formation on oleanders. Physiol. Plant Pathol., 13, 203-214.

SMITH E.F., 1911. Bacteria in relation to plant disease. Carnegie Institute, 3, 90,-94. Washington D.C.

STEVENS F.L., 1913. The fungi which cause plant disease. Macmillan, New-York.

SOMERVILLE R.L. & YANOFSKY C., 1965. Studies on the regulation of tryptophan biosynthesis in *Escherichia coli*. J. Molecul. Biology, 11, 747-759.

SURICO G., 1988. Indol acetic acid and cytokinins in the olive knot disease. An overview of their role and their genetic determinants. Biology and Molecular Biology of Plant Pathogen Interaction. Ed. J. Baily, 315-329.

SURICO G., COMAI L. & KOSUGE T., 1984. Pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* and their Indol Acetic Acid deficient mutants on olive and oleander. Phytopathology, 74, 490-493.

SURICO G., SPARAPANO L., LERARIO P., DURBIN R.D., and IACOBELLIS N., 1975. Cytokinin-like activity in extracts from culture filtrates of *Pseudomonas savastanoi*. Separatum EXPERIMENTIA, 31, 929-930.

THIMANN K.V., 1963. Plant growth substances, past, present and future Annu. Rev. Plant Physiol., 14, 1-18.

TORREY J.G., 1950. The induction of lateral roots and root decapitation. Amer. J. Bot., 37, 257-264.

WILSON E.E., 1965. Pathological histogenesis in oleander tumors induced by *Pseudomonas savastanoi*. Phytopathology, 55, 1244-1249.

WILSON E.E. & MAGIE A.R., 1963. Physiological, serological and pathological evidence that *Pseudomonas tonelliana* is identical with *Pseudomonas savastanoi*. Phytopathology, 53, 653-659.

YOUNG J.M. DYE D.W., BRADBURY J.F. PANAGOPULOS C.G. and ROBBS C.F., 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. N.Z.J. Agr. Res., 21, 153-177.