

EPIDEMIOLOGIE ET ETIOLOGIE DE *PSEUDOMONAS SAVASTANOI* PV. *SAVASTANOI*, AGENT CAUSAL DE LA TUBERCULOSE DE L'OLIVIER EN TUNISIE

Samira Krid^{1,2}, Mariem Gharsallaoui³, Mohamed Ali Triki² et Ali Rhouma²

Résumé

Durant la période 2006-2009, des prospections ont été réalisées dans plusieurs oliveraies en Tunisie (Ksouda, EL Karma, Ain Jloula, Ouled Haffouz, Bekalta, Ouedna, Bouzouita, Tunis, Matmata) pour évaluer le secteur infesté et la sévérité de la tuberculose de l'olivier. Soixante-deux souches bactériennes ont été isolées des tumeurs sur le milieu semi sélectif (B de King) et identifiées comme étant *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* en se basant sur les caractéristiques biochimiques (test LOPAT) et le test de pathogénie sur plant d'olivier. L'amplification et le séquençage du gène *iaaL* ont confirmé que les souches sélectionnées sont des *P. savastanoi* pv *savastanoi*. L'intensité de la maladie évaluée dans trois vergers Ouedna, Elkarma et Matmata a montré qu'elle est corrélée avec le nombre et le poids des tumeurs.

L'étude de l'effet de la maladie sur la qualité de l'huile d'olive a montré que les caractéristiques des huiles sont affectées en cas d'une forte attaque.

Mots clés: *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, tuberculose de l'olivier, qualité de l'huile d'olive, degré d'infestation.

Abstract:

During 2006-2009, an extensive survey for the olive knot disease pathogen was conducted in the major olive growing districts in Tunisia (Ksouda, Karma, Ain Jloula, Ouled Haffouz, Bekalta, Ouedna, Bouzouita, Tunis, Matmata) in order to estimate the infested area and disease severity. Sixty two bacterial strains were isolated from the knots on the semi-selective media (King B). The investigated strains were identified as *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* based on biochemical characteristics (LOPAT test) and pathogenicity test on olive plant. Amplification and sequencing of *iaaL* gene confirmed that the investigated strains belonged to *P. savastanoi* pv *savastanoi*. Disease severity evaluated in three orchards Ouedna, Elkarma and Matmata showed that it was correlated with the number and the weight of knots. However the diameter of shoots and the diameters of knots seem not to be. The disease influence olive oil quality in the case of a high infection.

Key words: *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, olive oil quality, disease severity, knot disease

Introduction

L'olivier est la principale espèce fruitière cultivée en Tunisie. L'oléiculture représente actuellement 16,1 % de la superficie oléicole mondiale (deuxième place après l'Espagne), L'olivier à huile occupe une surface de 1,7 millions d'hectares (ha) représentant plus de 30 % des terres agricoles (DGPA, 2009). Aujourd'hui, l'olivier est sujet à différents types d'attaques d'origine fongique ou bactérienne qui peuvent causer de sérieuses pertes économiques. C'est l'exemple de la tuberculose de l'olivier causée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (*P.s* pv *savastanoi*) qui est observée dans plusieurs régions, Chbika, Bekalta, Sidi Bouzid, Ouedna et Tunis (Krid *et al.* 2009). La maladie a été signalée pour la première fois à Sfax en 1905 suite à une forte chute de grêle (Jardak *et al.*, 2004). Plusieurs facteurs interviennent dans le déclenchement du processus infectieux telles que les blessures qui peuvent être naturelles comme celles causées par la chute des feuilles ou la grêle, ou mécanique dues à la taille ou la cueillette. L'effet des insectes est non négligeable aussi, en effet, il a été démontré par Jardak *et al.*, 2004 qu'un homoptère (*Ceresa* sp. Famille des Membracidae) qui en déposant ses œufs provoque des plaies qui constituent un site d'infection par la bactérie. Il existe une corrélation positive entre le nombre de tumeurs observées et la densité de la population de *Ceresa*.

Les conséquences économiques de cette maladie sont considérables sur la culture de l'olivier affectant aussi bien la qualité que le rendement en huile (Schroth *et al.*, 1968; 1973).

Cette étude est consacrée à la détermination de la distribution de la tuberculose de l'olivier en Tunisie ainsi qu'à la détermination du degré d'attaque dans des parcelles infestées et l'influence de la maladie sur la qualité de l'huile d'olive.

2. Matériels et méthodes

2.1. Distribution de la tuberculose de l'olivier

Des prospections au champ ont été menées en 2006-2009 dans plusieurs régions en Tunisie afin de réaliser une cartographie des différentes parcelles attaquées.

2.2. Echantillonnage et isolement à partir des tumeurs

L'échantillonnage a été réalisé en printemps et en automne en 2006-2009. Des jeunes tumeurs ont été prélevées de chaque parcelle et à partir de trois oliviers. Les échantillons ont été placés dans un sac plastique et transportés directement au laboratoire. Les tumeurs ont été désinfectées avec un papier filtre stérile imbibé avec l'éthanol 95 % (Marchi *et al.*, 2005). Le tissu interne a été découpé finement à l'aide d'un scalpel stérile. Les fragments obtenus ont été écrasés à l'aide de piston-pellets dans des tubes Eppendorfs stériles contenant 200 µl d'eau distillée stérile (EDS).

Après 30 mn, 10 µl du surnageant a étéensemencée sur des boîtes de Pétri contenant le milieu semi sélectif B de King (King *et al.*, 1954) et incubées à 26°C pendant 3 à 5 jours.

2.3. Identification par les tests biochimiques et biologiques

Les tests biochimiques appelés LOPAT ont été réalisés: levan, oxydase, activité pectinolytique, présence de l'arginine déshydrolase et hypersensibilité sur feuilles de tabac (Lelliott *et al.*, 1966). Le test du pouvoir pathogène a été effectué sur des oliviers âgés d'une année. L'inoculation a été réalisée au niveau des tiges principales en introduisant 10 µl d'une suspension bactérienne (10^8 UFC/ml) issue d'une culture âgée de quarante huit heures au niveau d'une blessure pratiquée à l'aide d'un scalpel stérile. L'incision est, ensuite, couverte par un coton enlevé après une semaine. Les plants d'oliviers sont, ensuite, placés dans la salle de culture à une température variant entre 25 et 30 °C. Deux souches de références (PVBa 206 and IVIA 1628-3) connues par leur effet pathogènes ont été utilisées comme témoin positif

2.4. Extraction de l'ADN et amplification du gène *iaaL*

L'ADN est extrait des bactéries suivant la méthode décrite par Llop *et al.* (1999).; Le gène *iaaL* est amplifié puis séquencé en utilisant les amorces IAALF/IAALR (Penyalver *et al.*, 2000). La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume réactionnel de 25 µl contenant 50 ng d'ADN ; l'eau distillée ; 5 µl du tampon PCR 5X (Proméga) ; 0,7µl $MgCl_2$ (25 mM) ; 0,5 µl (22 µM) de chaque amorce ; 0,5 µl dNTP (10 mM), 1 unité de Taq polymérase (Proméga) et 15 µl d'eau distillée stérile.

L'amplification a été réalisée selon le programme PCR suivant : Une dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 mn suivie de 50 cycles. Chaque cycle est composé de 30 s de dénaturation 94 °C, 30 s d'hybridation à 62 °C et 30 s de polymérisation à 72 °C. Un dernier cycle est fait à 72 °C pendant 5 mn. Une fois l'amplification est achevée, les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Les produits d'amplification sont purifiés par le 'KitWizard SV Gel and PCR Clean-up System' (Promega) puis séquencés par un séquenceur automatique (ABI 3100; Applied Biosystems). Les séquences obtenues ont été comparées à celles disponibles dans la base de données à partir de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.5. Détermination du degré d'infestation

L'étude du degré d'attaque a été réalisée dans des parcelles situées dans trois régions différentes (Bouzouita, ElKarma et Matmata). Les oliviers sont inégalement affectés par la maladie, ainsi trois niveaux d'attaque ont été définis pour chaque parcelle étudiée. Des arbres définis

comme étant faiblement attaqués, d'autres sont moyennement attaqués et finalement des arbres fortement attaqués. Des tiges de 40 cm de longueur ont été prélevées d'oliviers fortement, moyennement et faiblement attaqués par la maladie dans la région de Kairouan (ElKarma), Sfax (Bouzouita) et Gabès (Matmata). Le nombre de tumeurs par cm ainsi que le diamètre et le poids des tumeurs ont été déterminés. Le diamètre des rameaux a été aussi déterminé.

2.6. Effet de la maladie sur la qualité de l'huile d'olive

Deux échantillons de 2 kg d'olives ont été récoltés d'olivier faiblement attaqués par la maladie dont le nombre moyen de tumeurs développées sur les rameaux est de 0,06/cm. D'autres fruits issus d'olivier fortement attaqués présentant un nombre de tumeurs de 0,15/cm ont été aussi prélevés. Des olives provenant des oliviers indemnes ont été incluses afin de servir comme témoins. Les olives ont été prélevées de la variété Chemlali cultivée dans la région de Kairouan (Elkarma). Les paramètres de qualité de l'huile extraite étudiés sont l'acidité et le coefficient d'extinction spécifique. Les analyses sont réalisées selon la norme internationale pour la commercialisation de l'huile d'olive et de l'huile de grignons d'olive préconisé par le Conseil Oléicole International (COI, 2001)

a. Acidité

La technique consiste à doser les acides gras libérés lors de l'hydrolyse des chaînes de triglycérol, après extraction de l'huile d'olive, par une solution de soude à 0.177N.

b. Extinction spécifique (K232 et K270)

Le dosage des produits d'oxydation de l'acide linoléique est effectué en mesurant les absorbances aux longueurs d'onde 232 nm et 270 nm.

2.7. Analyses statistiques

L'efficacité des différentes mesures a été évaluée par l'analyse de la variance (ANOVA) en utilisant le logiciel SPSS. La comparaison des moyennes a été effectuée par le test Duncan à la probabilité de 5 %.

3. Résultats et discussion

3.1 Distribution de la tuberculose de l'olivier

Les prospections au champ effectuées, dans plusieurs régions en Tunisie, ont permis de constater que la maladie est principalement concentrée au centre du pays, elle existe aussi au Nord (Tunis) et même au Sud du pays (Matmata) (Figure 1). L'apparition de la maladie dans les régions du Centre et du Sud Est du pays (ElKarma et Bouzouita) étant favorisée par des conditions climatiques telle que la chute de grêle causant des blessures au niveau des rameaux, le vent et la pluie. Par contre, la découverte de la maladie au Sud dans la région de Matmata (Djbel Toujen)

est due plutôt à des micro-blessures apparues suite à la chute des feuilles ou au moment de la cueillette. Les vents de sable peuvent aussi avoir un rôle dans l'apparition de la maladie. Ainsi, ils peuvent causer des blessures au niveau des rameaux, ce qui permet à la bactérie de s'installer sur la plante et d'initier le processus infectieux.

3.2. Identification par les tests biochimiques et biologiques

62 isolats ont été obtenus à partir de tumeurs prélevées d'oliviers de variétés (Chemlali, Chetoui, Oueslati and Zarrazi; Tableau 1) situés dans neuf parcelles différentes. Deux souches obtenues d'autres pays sont incluses pour la comparaison.

Les isolats locaux (Tableau 1) ont été analysés par les tests biochimiques et par le test de pathogénie. Ils présentent les caractéristiques suivantes: oxydase-négatif, levan-négatif, activité pectinolytique négatif, arginine déshydrolase-négatif et hypersensibilité sur feuille de tabac positif. Ces isolats, inoculés sur les plants d'oliviers, développent des tumeurs identiques à celles observées pour la souche de référence IVIA 1628-3.

Des bandes au même niveau que celles générées avec les souches de référence IVIA 1628 et PVBa206 et ayant la taille de 454 pb ont été obtenues (Figure 2). Le séquençage du gène *iaaL* montre une similarité de 98% avec les séquences trouvées dans la base des données de NCBI (nombre d'accèsion EU616803.1). Cela signifie qu'il s'agit bien du gène qui code pour la conversion de l'AIA en AIA-Lysine. En se basant sur les tests biochimiques, l'amplification et le séquençage du gène *iaaL*, tous les isolats sont *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi*.

3. 3. Détermination du degré d'infestation

Dans le tableau 2 sont consignés d'une part le nombre, le diamètre et le poids des tumeurs, et d'autre part le diamètre des rameaux. L'analyse de la variance a montré un effet significatif du degré d'attaque sur le nombre de tumeurs par cm pour chaque région étudiée. En effet, une forte attaque est déterminée par un nombre de tumeurs qui varie de 0,15 à 0,18 selon la région. Ces résultats sont en concordance avec ceux trouvés par Benjama *et al.* (2003) qui ont démontré une corrélation parfaite entre le nombre de tumeurs et l'intensité des dégâts provoqués par la maladie. Cependant, si nous considérons une forte attaque, aucune différence significative n'a été enregistrée entre le nombre de tumeurs en passant d'une région à une autre. En considérant le diamètre des tumeurs, et en se basant sur les analyses statistiques, aucune différence significative n'a été décelée. Par ailleurs, le degré d'attaque semble avoir une influence sur le poids des tumeurs. En effet, pour chaque région, une différence significative a été enregistrée entre une faible et une forte attaque. Donc le poids moyen des tumeurs est d'autant plus important que l'intensité d'attaque est importante. Un poids

élevé est en relation avec un nombre de tumeurs élevé aussi. Par contre, il n'existe pas de différence significative entre le degré d'attaque et le diamètre des rameaux. Par conséquent, nous pouvons déduire que l'intensité d'attaque n'est pas corrélée avec le diamètre des rameaux.

3. 4. Effet de la maladie sur la qualité de l'huile d'olive

a. Acidité

Dans le tableau 3 sont consignées les valeurs de l'acidité. les résultats obtenus montrent que toutes les huiles, sujet de notre études, appartiennent à la catégorie Vierge Extra, quelque soit le degré d'infestation, avec des acidités inférieures à 0.8 %, la limite fixée par la Commission de Union Européenne (EEC Régulation no. 702/2007), pour la catégorie Vierge Extra. L'analyse des données par le logiciel SPSS montre une différence significative de l'acidité des huiles extraites à partir d'olives récoltés de plants fortement attaqués en comparaison avec le témoin. On constate que l'acidité est plus élevée pour les échantillons pris d'arbres attaqués. Elle est d'autant plus importante que le degré d'attaque est plus fort. Une différence significative a été enregistrée entre les valeurs de l'acidité de l'huile d'olive du témoin et celles provenant d'une forte attaque. Alors qu'aucune différence n'est observée en cas d'une moyenne attaque. Ces résultats confirment ceux obtenus par Schroth *et al.* (1968, 1973) qui ont montré une perte des caractéristiques organoleptiques des huiles extraites et une diminution du rendement. Ceci peut être dû à la diffusion de toxines ou de métabolites contenus dans les tumeurs ou une réduction dans la translocation des solutés (Schroth *et al.*, 1968).

b. L'extinction spécifique à 232 et 270 nm

L'absorbance de l'huile à 232 nm (K232) nous renseigne sur l'évolution de la peroxydation de l'huile analysée et la formation d'hydro peroxyde linoléique alors que l'absorbance à 270 nm (K270) nous renseigne sur sa teneur en produits secondaires d'oxydation (des cétones et des aldéhydes).

Les résultats du tableau 4 montrent que toutes les huiles obtenues possèdent des K232 qui dépassent la limite (2.5) fixée par EEC Régulation no. 2568/91 pour la catégorie d'huile d'olive "Vierge Extra ". Ces valeurs assez élevées peuvent être dues au fait que les fruits récoltés n'étaient pas triturés directement après leur cueillette. Par contre les absorbances à 270 nm ne dépassent guère 0.22, la limite fixée pour la catégorie d'huile d'olive «Vierge Extra». L'étude statistique montre une différence significative des absorbances dans l'UV entre l'huile témoin et celle provenant d'une forte attaque. Cependant, les valeurs de l'extinction spécifique (K232 et K270) des huiles provenant d'une moyenne attaque ne présentent pas une différence significative avec le témoin.

4. Conclusion

La tuberculose de l'olivier existe du Nord au Sud du pays. L'épidémiologie sur champs a montré que le degré d'infestation est en corrélation avec le nombre et le poids des tumeurs. La maladie affecte la qualité de l'huile seulement en cas d'une forte infestation.

Références bibliographiques

Benjama A., 2003. Méthode d'évaluation rapide du degré d'attaque de l'olivier par la tuberculose cause par *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* en verger au Maroc. Fruits, 58, 213-219.

Conseil Oléicole International, 2001. Normes commerciales internationales applicables aux huiles d'olives et aux huiles de grignons d'olive, 19p.

Jardak T., Jerraya A. et Mahjoub M., 2004. La protection intégrée de l'oléiculture dans les pays de l'Afrique du Nord. FAO, Bureau sous régional pour l'Afrique du Nord, SNEA-Tunis. Tunisie, 69-71.

Llop P., Caruso P., Cubero J., Morente C et Lopez M.M., 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. J. Microbiol Methods, 37, 23-31.

Lelliott R.A., Billing, E. et Hayward, A.C. (1966) A determinative schema for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. J Appl Bacteriol, 29, 470–489.

King E.O., Ward M.K. et Raney D.E., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J Lab Clin Med, 44, 301–307.

Penyalver R., García A., Ferrer A., Bertolini E., López M.M., 2000. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. App Environ Microbiol, 66: 2673-7.

Schroth M N., Hildebrand D C et O'Reilly H J., 1968. Off-flavor of olives from trees with olive knot tumors. Phytopathology, 58, 524–525.

Schroth M N., Osgood J W et Miller T D., 1973. Quantitative assessment of the effect of the olive knot disease on olive yield and quality. Phytopathology, 63, 1064–1065.

Krid S., Rhouma A., Queseda J.M, Penyalver R et Gargouri A., 2009. Delineation of *P savastanoi* pv *savastanoi* strains isolated in Tunisia by random-amplified polymorphic DNA analysis. J App Microbiology, 106, 886-894.

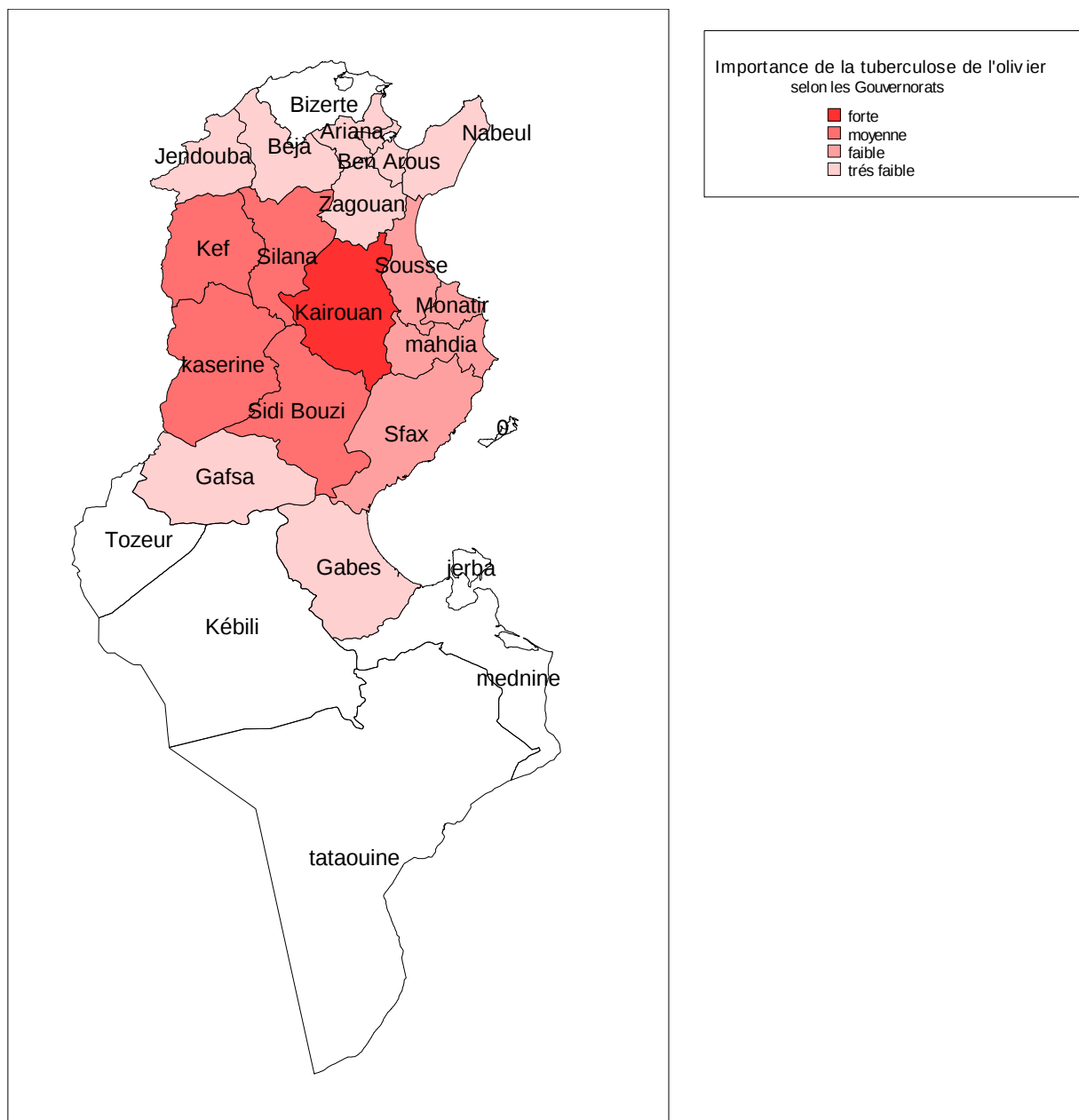


Fig. 1: Distribution de la maladie de la tuberculose de l'olivier en Tunisie

Tab. I: Caractéristiques et origine des échantillons

Isolat/souche	origine de l'échantillon		
	Région	Année	Variété
Ad2, Ad3, Ad4, Ad5, Ad6, Aw1, Aw2, Aw3, Aw4, Aw7, Aw8, Aw9	Ouedna	2006	Chemlali
Bz1, Bz2, Bz3, Bz4	Bouzouita	2007	Chemlali
KS2, KS4, KS5, KS6, KS7, KS8, KS9	Ksouda	2006	Chemlali
OH1, OH2, OH3, OH4, OH5, OH6	Ouled Haffouz	2006	Chemlali
K1, K2, K3, CH1, CH2, CH3, CH4	Chbika	2007	Chemlali
BK1, BK2, BK5, BK8, BK9, BK10, BK11	Bkalta	2006	Chemlali
O1, O3, O6, O7, O8, O9, O10, O11	Tunis	2006	Chetoui
Aj1, Aj2, Aj3, Aj4, Aj5, Aj6, Aj7	Ain Jloula	2006	Oueslati
MA1, MA2, MA3, MA4	Matmata	2009	Zarrazi
IVIA 1628	Valencia	1996	Cornicabra
PVBa 206	Apulia	1968	-

IVIA, Bacterial Collection from the Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada, Valencia, Spain;

PVBa, Culture Collection of Dipartimento di Patologia Vegetale, Università degli Studi, Bari, Italy;

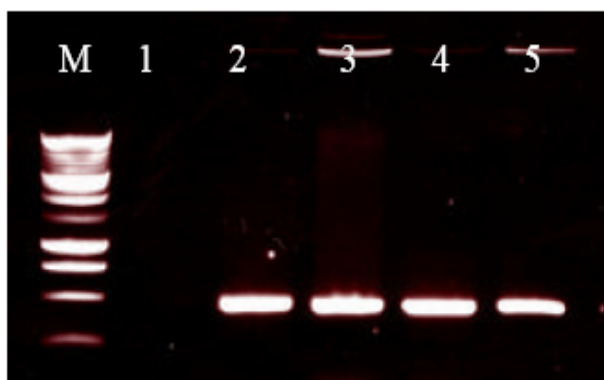


Fig. 2: Amplification par PCR du gène *iaaL* par les amorces IAALF/IAALR

M : 1Kb, 1: témoin négatif, 2: témoin positif IVIA 1628, 3: *Aj*₄, 4: *Bk*₆

*Aj*₄ : échantillon isolé de Ain Jloula

*Bk*₆ : échantillon isolé de Bkalta

Tab. II: Caractéristiques des échantillons de rameaux étudiés
FA: faiblement attaqué, MA: moyennement attaqué, FO: fortement attaqué, Bz:

	nombre de tumeurs/cm	diamètre des tumeurs (mm)	poids des tumeurs (g)	diamètre de la tige(mm)
FABz	0.075 bc	78,7 a	1,00 ab	5,23 b
MABz	0,13 ab	10,62 b	0,62 ab	4,30 b
FOBz	0,17 a	13,55 b	1,11 a	8,53 a
FAKa	0,06 c	9,05 b	0,32 b	5,62 b
MAKa	0,125 abc	14,77 b	1,32 a	5,63 b
FOKa	0,155 a	16,29 b	1,18 a	5,36 b
FAMa	0,06 c	9,59 b	0,33 b	4,62 b
MAMa	0,115 abc	15,28 b	1,08 ab	5,54 b
FOMa	0,18 a	15,24 b	1,19 a	4,63 b

Bouzouita, Ka: ElKarma, Ma: Matmata.

Les valeurs dans une même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan à la probabilité de 5 %.

Tab. III: Acidité de l'huile d'olive pour différents degrés d'attaque

Acidité	
	V _{NaOH} (ml)
Témoin (non attaqué)	0,22 a
Moyennement attaqué	0,20 a
Fortement attaqué	0,37 b

Les valeurs précédées de la même lettre ne sont pas significatives selon le test de Duncan à la probabilité de 5%.

Tab. IV: Détermination de l'extinction spécifique

	Extinction spécifique	
	232 nm	270 nm
Témoin (non attaqué)	2,9290 b	0,1084 b
Moyennement attaqué	2,8663 b	0,1042 b
Fortement attaqué	3,038 a	0,1196 a