

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar Telidji Laghouat

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : Zeghib zineb

DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : SCIENCES AGRONOMIQUES

OPTION : PROTECTION DES VEGETAUX



Thème

**Identification préliminaire de quelques isolats bactériens  
chez l'olivier**

Jury de soutenance :

<b>Nom et prénom</b>	<b>Grade</b>	<b>Qualité</b>
Mr. Amara yacine	MCB.	Président
Mme. Hattab Touati siham	MCB.	Examineur
Mlle. Zaza messaouda	MAA.	Encadreur

Promotion : 2022-2023

# **Remerciements**

*Le grand Merci je le réserve à **DIEU** le tout puissant pour le courage et la volonté qu'il m'a accordé pour mener à bien mon travail.*

*Ce mémoire n'aurait pu être réalisé sans l'appui et l'impulsion, donnés par : **Mlle Zaza Mesaouda** Maître de conférences à L'Université de laghouat, qui a bien voulu assurer mon encadrement, qu'elle puisse ici trouver toute l'amabilité et la reconnaissance qu'elle mérite. Sa bienveillance et son soutien permanents afin d'aboutir à ce travail a été d'un apport considérable. Je lui dois une immense reconnaissance et un très grand respect.*

*Ainsi je remercie monsieur **Amara yacine**, qu'a bien voulu présider ce jury. Mme **Touati siham** qui a accepté d'examiner ce travail. Merci à nos ingénieurs de laboratoire pour leur soutien et leurs services.*

*A tous mes professeurs et enseignants du département d'Agronomie de Laghouat qui ont contribué à notre formation et plus spécialement ceux de la spécialité protection des végétaux.*

*Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis, qui nous ont toujours encouragés au cours de la réalisation de ce mémoire.*

**Merci à tous et à toutes.**

# ***Dédicaces***

*A mes chers parents Abderrahmane et Houria pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse et leur soutien tout au long de mes études, que dieu les garde et les protège.*

*A mon frère Abdelhamid*

*A ma sœur Soumia*

*A mes chers amis; Chaima, Fatna et Hanane qui m'a donnée la plus belle chose dans mon cœur.*

*A mes collègues Mehboubi israa et Megouci meriem pour les beaux moments dans laboratoire*

*A ma promotion 2023 sans exception*

## Résumé

### Résumé

La tuberculose de l'olivier causée par *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* est la maladie la plus répandue dans le monde, en particulier dans le bassin méditerranéen, elle provoque des pertes dans les cultures d'olivier. L'objectif de cette étude est l'isolement et l'identification des bactéries responsables des tumeurs de l'olivier dans la région de djelfa. Un total de 25 isolats bactériens ont été identifiés par des tests biochimiques : (la coloration des Gram, test KoH, la Fluorescence sur King B, le test Hugh et Leifson). D'après ces tests, les 25 isolats sont des Bacilles Gram négatifs, fluorescentes et aérobies strictes. Ces tests confirment que nos isolats sont des *Pseudomonas*. Le test LOPAT montre que ces isolats sont des Levane négatif et des oxydase négatif alors que, 23 isolats sont des pectinase négatif, arginine dihydrolase négatif. Le test tabac montre que les 7 isolats testés sont des *Pseudomonas savastanoi*.

**Mots clés** : *Pseudomonas savastanoi*, olivier, tests biochimiques, LOPAT.

### ملخص

سل شجرة الزيتون الناجم عن *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* هو المرض الأكثر انتشاراً في العالم، لا سيما في حوض البحر الأبيض المتوسط، يتسبب في خسائر في محاصيل الزيتون. الهدف من هذه الدراسة هو عزل وتحديد البكتيريا المسؤولة عن أورام الزيتون في منطقة الجلفة. كان ما مجموعه 25 عزلة بكتيرية تم تحديد هويتها من خلال اختبارات الكيمياء الحيوية: (تلوين الغرام، اختبار KoH، اختبار fluorescence على King B و Hugh et Leifson) و بناءً على هذه الاختبارات، فإن جميع العزلات الـ 25 سلبية الغرام، و fluorescentes وهي عبارة عن عصيات هوائية صارمة، تؤكد هذه الاختبارات أن عزالتنا هي *Pseudomonas*. يُظهر اختبار LOPAT أن هذه العزالت سلبية levan و سلبية oxydase بينما 23 عزلة سلبية pectinase، سلبية arginine dihydrolase يُظهر اختبار التبغ أن العزالت الـ 7 التي تم اختبارها هي *Pseudomonas savastanoi*.

**الكلمات الرئيسية**: *Pseudomonas savastanoi*، شجرة زيتون، اختبارات كيميائية حيوية، LOPAT.

## Résumé

---

### Abstract

Olive knot caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* is the most widespread disease in the world, especially in the Mediterranean basin, it causes losses in olive crops. The objective of this study is the isolation and identification of the bacteria responsible for olive tumors in the djelfa region. A total of 25 bacterial isolates were identified by biochemical tests: (Gram staining, KoH test, Fluorescence on King B, Hugh and Leifson test). Based on these tests, all 25 isolates are Gram-negative, fluorescent, and strict aerobic bacilli, these tests confirm that our isolates are *Pseudomonas*. The LOPAT test shows that these isolates are Levane negative and oxidase negative whereas, 23 isolates are pectinase negative, arginine dihydrolase negative. The tobacco test shows that the 7 isolates tested are *Pseudomonas savastanoi*.

**Keywords:** *Pseudomonas savastanoi*, olive tree, biochemical tests, LOPAT

# SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE</b>	
Résumé	
Remerciements	
Dédicace	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	01
<b>Chapitre I : Généralité sur l'olivier</b>	
1. Historique et l'origine	04
2. Classification	04
3. Formes de l'olivier	05
4. Morphologie de l'olivier	05
4.1 Système racinaire	05
4.2. Feuilles	06
4.3. Fleurs	06
4.4. Fruits	06
5. Cycle annuelle de l'olivier	07
6. Répartition géographique des oliviers	07
7. Les plantations des oliviers en Algérie	08
8. Les variétés de l'olivier en Algérie.	11
9. Les maladies et ravageur de l'olivier	12
<b>Chapitre II : Tuberculose de l'olivier</b>	
1. Historique de la maladie	14
2. Classification de la maladie	15
3. Cycle de vie de la maladie	15
3.1.La phase épiphyte	15
3.1.La phase endophyte	15
4. Symptômes de la maladie	16
5. Répartition géographique de la maladie	16
6. Les dommages	17
7. Méthodes de lutte	18

# SOMMAIRE

<b>Chapitre III : Materiel et méthodes</b>	
<b>1. Echantillonnage</b>	<b>20</b>
<b>2. Isolement</b>	<b>20</b>
<b>3. Purification</b>	<b>21</b>
<b>4. Identification du genre</b>	<b>22</b>
<b>4.1. Coloration de Gram</b>	<b>22</b>
<b>4.2. Test KoH</b>	<b>23</b>
<b>4.3. Test de fluorescence</b>	<b>23</b>
<b>4.4. Test Hugh et Leifson</b>	<b>23</b>
<b>5. Identification de l'espèce (LOPAT)</b>	<b>24</b>
<b>5.1. Test Levanesucrase</b>	<b>24</b>
<b>5.2. Test oxydase</b>	<b>25</b>
<b>5.3. Test pectinase</b>	<b>25</b>
<b>5.4. Test arginine dihydrolase</b>	<b>26</b>
<b>5.5. Test hypersensibilité sur tabac</b>	<b>26</b>
<b>Chapitre IV: Résultat et discussion</b>	
<b>1. Isolement</b>	<b>29</b>
<b>2. Test de Gram</b>	<b>29</b>
<b>3. Test KoH</b>	<b>29</b>
<b>4. Test de fluorescence</b>	<b>30</b>
<b>5. Test Hugh et Leifson</b>	<b>30</b>
<b>6. Test LOPAT</b>	<b>33</b>
<b>6.1 Test Levane sucrase</b>	<b>33</b>
<b>6.2. Test oxidase</b>	<b>34</b>
<b>6.3. Test pectinase</b>	<b>34</b>
<b>6.4. Test arginine dihydrolase</b>	<b>35</b>
<b>6.5. Test hypersensibilité sur tabac</b>	<b>35</b>
<b>Discussion</b>	<b>39</b>
<b>Conclusion</b>	<b>42</b>
<b>Référence bibliographique</b>	<b>43</b>

# SOMMAIRE

---

---

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> Classification de l'olivier	07
<b>Tableau 02</b> Les maladies et ravageur de l'olivier	12
<b>Tableau 03</b> Les résultats des tests de genre	31
<b>Tableau 04</b> Les résultats des tests de l'espèce	37

# SOMMAIRE

## Listes des figures

<b>Figure 1</b> Répartition géographique de l'olivier dans le méditerranéens	08
<b>Figure 2</b> Bactérie <i>pseudomonas savastanoi</i>	14
<b>Figure 3</b> Symptôme de la maladie	16
<b>Figure 4</b> Protocoles de l'isolement	21
<b>Figure 5</b> Test KoH	23
<b>Figure 6</b> Test levane sucrase	24
<b>Figure 7</b> Test pectinase	25
<b>Figure 8</b> Test Arginine dihydrolase	26
<b>Figure 9</b> Test hypersensibilité sur tabac	27
<b>Figure 10</b> Résultat de coloration de Gram	29
<b>Figure 11</b> Résultat de test KoH	30
<b>Figure 12</b> Résultat de test Hugh et Leifson	31
<b>Figure 13</b> Résultat de test levane sucrase	33
<b>Figure 14</b> Résultat de test oxydase	34
<b>Figure 15</b> Résultat de test pectinase	35
<b>Figure 16</b> Résultats de test arginine dihydrolase	35
<b>Figure 17</b> Résultat de test hypersensibilité sur tabac	36

# SOMMAIRE

---

## Liste des abbreviations

FAO : Food and Agriculture Organisation of the united nations.

COI : Conseil Oléicole International.

DSA : Direction des Services Agricoles.

g : gramme.

ml : millilitre.

ha : hectare.

n° : numéro.

% : pourcentage.

µm: Micromètre.

q/ha : Quintaux par Hectare.

C° : degré Celsius.

mn : minute.

cm : centimètre.

t: tonne.

h : heure.

m : mètre.

UE : Union Européenne

Qtx : Quintaux .

# Introduction

---

## Introduction

L'olive (*Olea europaea* L.) est une espèce vivace à feuilles persistantes appartenant à la famille des oléacées. Elle représente l'une des cultures les plus importantes du bassin méditerranéen, représentant 98 % de la superficie oléicole cultivée dans le monde (FAOSTATS, 2019).

Une superficie totale de 10 578 246 hectares (ha) est consacrée à la culture de l'olivier à travers le monde. Les principaux pays producteurs d'olives sont Espagne, Italie, le Maroc et la Turquie, dans cet ordre. En ce qui concerne la Turquie, elle a une production l'olive évaluée à 1 525 000 tonnes, cultivées sur une superficie de 879 177 hectares de terres en activité (FAO, 2019).

En Algérie l'olivier joue un rôle central dans économie agricole. Sa situation géographique dans le bassin méditerranéen lui offre un climat optimal pour une production l'olive de haute qualité et en grande quantité. Avec plus de 35 millions oliviers, Algérie produit en moyenne un million de tonnes l'olive par an. Cependant, de nombreux insectes et agents pathogènes menacent la santé des oliviers, mettant ainsi en péril la production olives. Le nombre de ravageurs et de maladies, ainsi que leur fréquence, a considérablement augmenté au cours des dernières années, causant importants dommages à la production d'olive (Halimi et *al.*, 2022).

Les oliviers souffrent de plusieurs maladies, y compris la maladie du tumeur de l'olivier. Elles sont l'une des maladies les plus importantes de l'olivier (*Olea europaea* L.) dans le monde (Schroth et *al.*, 1973), peut entraîner importantes pertes de production et de qualité de l'huile de l'olive. Cette se caractérise principalement par la formation de tissus de croissance excessive, appelés noeuds, sur les parties aériennes de olivier, notamment sur les branches et les rameaux (Wilson, 1935). *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) est l'agent causal de cette maladie et est considéré comme une des principales menaces pour la production d'olives, en particulier dans la région méditerranéenne, où les conditions climatiques favorisent souvent la propagation de la maladie (Gardan et *al.* , 1992 et Quesada et *al.*, 2012 ). Bien que la maladie ne conduise que rarement à la mort de arbre, elle peut avoir un impact grave sur la production olives (Schroth et *al.*, 1973 et Quesada et *al.*, 2010)

La tuberculose de l'olivier est une maladie grave qui affecte les arbres d'oliviers et constitue l'un des principaux problèmes pour la qualité l'huile d'olive et les rendements des

## **Introduction**

---

fruits. Le principal défi de cette maladie réside dans le fait qu'elle n'apparaît souvent pas clairement à ses débuts, et lorsqu'elle est découverte, elle a déjà causé des dommages importants aux arbres et aux récoltes.

Dans cette étude, des symptômes similaires à ceux causés par la bactérie responsable de la tuberculose d'olivier ont été observés dans une oliveraie de la région de djelfa. Dans l'objectif de déterminer la bactérie responsable de ces tumeurs, nous avons fait l'isolement et l'identification de l'agent causal utilisant des tests biochimiques et physiologiques

Notre plan de travail a été divisé en deux étapes : la première étape théorique où nous avons parlé de quelques généralités sur l'olivier et de l'agent pathogène responsable de la tuberculose de l'olivier. Dans la partie pratique, nous avons présenté les méthodes d'isolement et les tests biochimiques d'identification et nous avons essayé d'interpréter et discuter les résultats obtenus.

# **Généralités sur l'olivier**

## 1. Historique et l'origine

L'olivier (*Olea europaea* ssp. *europaea*.) est l'un des plus anciens arbres cultivés. C'est une espèce emblématique en raison de son importance écologique, économique et culturelle, en particulier dans le bassin méditerranéen (Nadine, et al., 2014).

Les connaissances des origines de la domestication de l'olivier au Moyen-Orient et des processus qui régissent son extension et sa persistance dans différents types de végétations de la préhistoire à l'antiquité à l'époque moderne dérivent de plusieurs sources ; selon ses ressources le Moyen-Orient est le berceau de la culture de l'olivier, et où l'histoire évolutive de cet arbre symbolique est entrelacée avec l'histoire des civilisations. Depuis la préhistoire, les fruits d'olive, l'huile et le bois ont été des produits distinctifs de la terre méditerranéenne. Dans les économies nationales de ces pays (Kaniewski et al., 2012).

L'olivier s'est répandu par la civilisation phénicienne au Liban, s'étendant au-delà de la Méditerranée et introduisant plus tard des oliviers à Carthage (Afrique du Nord) et en Espagne (Teral, 2000). En outre, les Phéniciens ont répandu l'olivier sur les rives de la mer Méditerranée en Afrique et en Europe du Sud jusqu'au sud de l'Italie, la Sicile, la Corse et la Sardaigne que les olives ont été trouvés dans les cimetières égyptiens de 2000 avant JC. (Ioannis, 2009).

La culture de l'olivier remonte en Algérie à la plus haute antiquité. Nos paysans s'y consacraient avec art durant plusieurs siècles. L'olivier et ses produits constituaient alors l'une des bases essentielles des activités économiques de nos populations rurales. L'huile d'olive faisait l'objet d'un commerce intense entre l'Algérie et Rome durant l'époque romaine (Alloum, 1974).

## 2. Classification de l'olivier

L'olivier, *Olea europaea* L., appartient aux *Oleaceae*, une famille de taille moyenne comprenant environ 25 genres et 600 espèces réparties dans les régions tempérées et tropicales du monde. (Besnard et al., 2009). Selon Conquiste (1981), l'olivier est classé comme suit:

Classe : *Magnoliopsida*.

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : *Scrophulariales*.

Famille : *Oleaceae*.

Sous-famille : *Oleoideae*

Genre : *Olea*.

Espèce : *Oléa europea*

### 3. Types de l'olivier

- **Olivier cultivé**

L'olivier cultivé est un arbre d'une hauteur de 5 à 10 m au tronc sinueux dont l'écorce est crevassée qui présentent des feuilles lancéolées persistantes de 2 à 3 ans et des fruits de forme et de teneur en huile assez variables selon la variété considérée. Sa longévité et sa productivité dépassant la centaine d'années et la production commence après 5 à 6 ans de plantation (Fabbri et *al.*, 2009).

- **Olivier sauvage**

Arbuste d'aspect buissonnant et épineux au ras du sol. Branches disposées Plus régulièrement aux rameaux plus ou moins quadrangulaires se terminant souvent en une pointe raide et piquante. Petites feuilles (4 cm de long environ), plus clairsemées, plus étroites, plus courtes et plus vertes. Fruits nombreux mais plus petits, moins charnus, plus luisants... Donne une huile fine mais peu abondante. Plus rustique, résiste mieux aux excès de température. Sa longévité et les qualités de son bois surpassent celles de l'olivier cultivé (Pagnol, 1975).

### 4. Morphologie de L'olivier

L'olivier est un arbre sempervirent à longue durée de vie atteignant 1000 ans, ou plus. Les oliviers ont une résistance titanesque qui les rend presque immortels malgré les hivers froids et les étés très chauds et secs qu'ils continuent à pousser, portant des fruits qui nourrissent et guérissent (Ioannis, 2009) :

#### 4.1. Système racinaire

Après trois à quatre ans, l'olivier forme un système racinaire vasculaire qui grandit avec l'âge. Les racines stabilisent l'olivier et absorbent l'eau et les nutriments du sol. Le système racinaire s'étend beaucoup plus loin. Les racines latérales peuvent mesurer jusqu'à 12 mètres de long, ce qui indique que l'olivier explore un grand volume de sol à la recherche de

nutriments et d'eau. Dans les sols lourds et ventilés, les racines d'olivier sont concentrées près de la surface du sol, contrairement à celles qui poussent dans des sols plus légers où les racines poussent plus profondément (Kailis et Harris, 2007)

### 4.2. Fleurs

Après une exposition à basse température, les bourgeons latéraux de l'olivier se développent en inflorescences tandis que les bourgeons terminaux continuent à croître végétativement. Habituellement, 15 à 30 petites fleurs blanc cassé sont constituées d'une inflorescence racémeuse (Fabbri et *al.*, 2004).

### 4.3. Fruit

Les fruits de l'olive sont de petits fruits de forme sphérique ou ovale. Ces fruits se composent de plusieurs parties :

Placage extérieur : est la couche externe du fruit et est généralement vert lorsqu'il est immature et devient noir ou brun foncé lorsqu'il est complètement mature.

Pulpe (mésocarpe) : C'est la partie interne du fruit qui est habituellement consommée. La couleur de la pulpe est verte lorsque les olives sont immatures et deviennent noires ou brunes lorsqu'elles sont mûres. (Ioannis, 2009)

### 4.4. Les feuilles

Les feuilles d'olivier sont épaisses, coriaces et opposées. Chaque feuille pousse sur une période de 2 ans. Les feuilles ont des stomates sur leurs surfaces seulement qui limitent la perte d'eau et rendent l'olive relativement résistante à la sécheresse. Certains poils multicellulaires sont présents sur la surface des feuilles. Les feuilles d'olivier s'abscisent habituellement au printemps à l'âge de 2 ou 3 ans; cependant, comme pour les autres conifères, les feuilles de plus de 3 ans sont souvent présentes ( Innocenzo , 2012).

**5. Cycle annuel**

D'après Muzzalupo et Micali (2015), Le cycle biologique de l'olivier est résumé dans le tableau suivant :

phases phénologiques	Périodes	Apparence
Dormance	Décembre janvier	/
Différenciation des boutons Floraux	Février	/
Reprise végétative	Fin février	Croissance d'une nouvelle végétation
Bourgeons en fleurs	Mi-mars	Développement des inflorescences
Floraison	Début Mai Mi Juin	/
Mise à fruits	Fin mai - Fin juin	Fanaison des fleurs et apparition des fruits
Première phase de croissance des fruits	Deuxième quinzaine de juin Mi-juillet	/
Trempe au puits	Fin juillet	Arrêt de la croissance des fruits
Deuxième phase de croissance des fruits	août octobre	grossissement du fruit - début de la lipogénèse
Véraison	octobre novembre	La coloration du fruit passe du vert au rouge violacé
Maturité	Novembre Décembre	La coloration du fruit passe du rouge violacé au noir

**Tableau 1 :** Phases phénologiques du cycle biologique annuel de l'olivier (*Olea europaea*)

**6. Répartition géographique des oliviers**

L'olivier (*Olea europaea* L.) est une plante à feuillage persistant qui vit longtemps et qui présente un intérêt culturel, économique et paysager pertinent (Loumou et Giourga, 2003). À l'heure actuelle, il y a environ 750 millions d'oliviers productifs dans le monde, les pays du bassin méditerranéen concentrant 95 % de la superficie cultivée mondiale (Chirici et Gianinetto, 2019).

Les oliviers prédominent dans les pays méditerranéens comme l'Espagne (25%), la Tunisie (13%), l'Italie (11%), le Maroc (10%), la Grèce (9%), la Turquie (8%), l'Algérie (4%), le Portugal (4%) et l'Égypte (1%) (FAO, 2018)



## **8. Les variétés d'olivier en Algérie**

Sidhoum et Gaouar (2017) rapportent qu'en Algérie il existe 164 variétés autochtones.

Mais les travaux de (Mendil et Sebay, 2006) ont permis de répertorier 72 variétés autochtones dont 36 sont homologuées. Ces derniers auteurs mentionnent parmi ces variétés :

- **Adjeraz de Seddouk :**

Arbre rustique et résistant à la sécheresse ; fruit de poids élevé et de forme allongée ; utilisé pour la production d'huile et olive de table, rendement en huile 24% à 28%

- **Chemlal de Kabylie :**

Variétés rustique et tardive, le fruit est de poids faible et de forme allongée, destiné à la production d'huile le rendement en huile de 18 à 22%.

- **Limli:**

Variété précoce, peu tolérante au froid, résistante à la sécheresse ; le fruit est de poids faible de forme allongée, utilisée dans la production d'huile, le rendement varie de 20% à 24%

- **Blanquette de Guelma**

Sa rigueur est moyenne, résistant au froid et moyennement à la sécheresse ; le fruit de poids moyen et de forme ovoïde, destiné à la production d'huile, le rendement varie entre 18% et 22%, la multiplication par bouturage herbacé donne un bon résultat 43.4 %

- **Ferkani, ferfane**

Variété de vigueur moyenne, résistante au froid et à la sécheresse, le poids de fruit est moyen et de forme allongée, production d'huile et rendement très élevés 28% à 32%, le taux d'enracinement des boutures herbacées de 52.30% ; variétés en extension en régions steppiques et présahariennes.

• **Rougette de Mitidja**

Variété rustique ; le fruit est moyen et allongé, utilisé pour la production d'huile, le rendement de 18% à 20%, le taux d'enracinement des boutures herbacées donne un résultat moyen de 48.3%

• **Sigoise ou olive de Tlemcen ou olive de Tell**

Variétés rustique, le fruit est de poids moyen et de forme ovoïde, produit une olive à deux fins est très recherchée pour la conserverie et donne un bon rendement en huile de 18 à 22%, le taux d'enracinement moyen est de 51.6%, elle est sensible au *Dacus* et au *Cyclonium*.

• **Longue de Maliana**

Variété tardive, sensible au froid et à la sécheresse ; le fruit est de poids moyen et de forme sphérique, utilisé pour la production d'huile et olives de table, rendement de 16 à 20%

**9. Maladies et insectes ravageurs d'olivier**

D'après (Bernès 1923 ; Graniti 1993 ; Ramos 2012 ; Angelini 1831 ; Lousert et Brousse, 1978) les principaux ravageurs et maladies d'olivier sont

le bio agresseur	présentation de la maladie	Symptômes et dégâts
Œil de paon	La tache de feuille d'olivier (OLS), également appelée tache de paon, est causée par le champignon <i>Spilocaea oleagina</i>	- Des taches de feuilles d'olivier se manifestent sur la surface supérieure des feuilles. - Feuillage tombant prématurément - Faiblesse et mort des branches
Tuberculose d'olivier	La maladie bactérienne la plus répandue causée par <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>Savastanoi</i>	-Formation des (galles ou nœuds tumoraux) sur les tiges et les branches de la plante hôte et, occasionnellement, sur les feuilles et les fruits - Affecte les cultures d'olives et la qualité de l'huile d'olive
La mouche de l'olivier	La mouche de l'olive <i>Bactrocera oleae</i> est un diptère qui s'attaque essentiellement aux fruits	-Elle cause la chute des fruits et la diminution du rendement en huile.

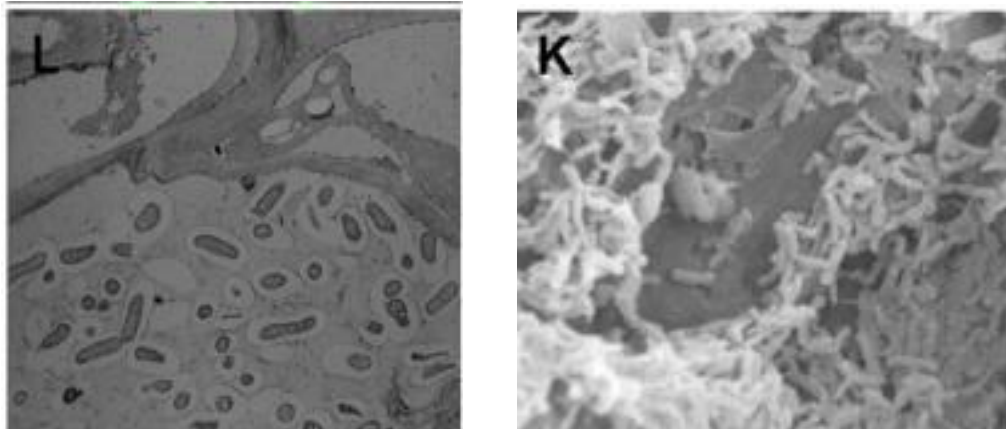
# **Chapitre II:**

## **Tuberculose de l'olivier**

**1. Historique de la maladie**

La tuberculose d'olivier a été observé pour la première fois par Theophrastus au IV<sup>e</sup> siècle BC, c'est une maladie grave qui affecte actuellement la production dans le bassin méditerranéen, où 98% des olives du monde sont produites. Anciennement connu sous le nom de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, il a été renommé en 1992 et fait toujours partie du complexe *P. syringae*. (Moretti et al., 2017).

Luigi Savastano a rapporté en 1886 que les bactéries étaient l'agent causal de la tuberculose d'olivier. elle a également été étudié par E.F. Smith aux États-Unis vers 1904 (Smith 1905), et à peu près à la même époque par El Petri en Italie (Petri 1907). Ces deux chercheurs ont confirmé les travaux de Savastano, mais ont rejeté l'identité des bactéries qu'il a isolées. En effet, selon Petri, les bactéries isolées prescrites par Savastano n'étaient pas réellement le facteur causal de la maladie mais étaient d'autres bactéries fréquemment associées à *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in knot tissue, *Pantoea agglomerans*). (Surico et Marchi, 2003)



**Figure 2** : bactérie de *pseudomonas savastanoi* (Ramos., et al 2012)

## **2. Classification de l'agent causal**

*Pseudomonas savastanoi* fait partie du complexe *Syringae*, comprenant au moins 60 pathovars et autres espèces *Pseudomonas* (Ramos et al., 2012). Cette bactérie est classée comme suit :

Domaine : *Bacteria*

Phylum : *Proterobacteria*

Class : *Gammaproteobacteria*

Famille : *Pseudomonadaceae*

Genre : *Pseudomonas*

Espèce : *Pseudomonas savastanoi*.

## **3. Cycle de vie de la maladie**

Le cycle de vie de la bactérie *Pseudomonas savastanoi* se compose de deux phases :

### **3.1. La phase épiphyte**

La maladie causée par les populations de Psv a un cycle épiphytique-pathogène. Les bactéries ont une phase épiphyte dans laquelle elles se multiplient à la surface des tiges et des feuilles d'olivier sans développer de symptômes. La plage de température à laquelle Psv peut commencer une infection est entre 5 et 37 degrés Celsius et cela permettra aux bactéries de causer une infection tout au long de l'année. Cependant, les conditions optimales pour la progression de la maladie sont d'environ 22-25 degrés Celsius et les périodes suivantes avec une forte probabilité d'infection sont l'automne et le printemps (Quesada et al., 2012).

### **3.1. La phase endophyte**

Les bactéries colonisent le tissu interne de l'hôte sans l'endommager ni provoquer de fortes réactions défensives. Les endophytes colonisent les espaces intercellulaires dans l'épiderme et les régions corticales et, dans certains cas, à faible densité cellulaire, les tissus vasculaires peuvent également être envahis permettant la propagation dans les bourgeons et la formation des nœuds (Buonauro et al., 2015).

#### **4. Symptômes de la maladie**

Les tumeurs se forment principalement sur les tiges et les branches, et sur le tissu en bois au lieu de tissu végétal. Le collier commence habituellement comme de petits blocs mous dans le collier ou sur l'écorce à l'intérieur. La coupe de ces nœuds immatures révèle des tissus apparemment pâles et sains entourant une pulpe foncée. Les tumeurs se développent pendant plusieurs mois et peuvent se dilater pour former des nœuds grossiers de plus de 2,5 cm de diamètre (Young, 2004).



**Figure 3 :** Symptômes de la maladie (Godena et *al.*, 2009)

#### **5. Répartition géographique de la maladie**

Maladie du tuberculose d'olivier causée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (ci-après Psv) est considéré comme l'un des plus maladies graves affectant les oliviers (*Olea europaea* L.) dans la plupart régions oléicoles dans le monde et principalement en Méditerranée pays, ce qui peut entraîner de graves dommages dans les oliveraies, causant pertes de production importantes (Buonaurio et *al.*, 2015)

Selon (Young, 2004) qui a parlé de la répartition géographique de la maladie des tumeurs d'olivier dans le monde comme suit :

**Europe :** Autriche, Chypre, France. **Asie :** Irak, Palestine, Liban, Turquie. **Afrique :** Algérie, Libye, Maroc, Tunisie. **Amérique du Nord :** Mexique, États-Unis (Arizona, Arkansas, Californie, Texas). **Amérique du Sud :** Argentine, Brésil, Colombie. **Australasie :** Australie (Nouvelle-Galles du Sud, Australie-Méridionale, Tasmanie, Victoria (tous enregistrés sur laurier-rose)

## 6. Les dommages

La maladie de tuberculose de l'olivier, causé par la bactérie *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* est une maladie courante et limitant dans de nombreuses zones oléicoles. La maladie se manifeste par la production des excroissances, de 2 à 10 cm de diamètre, qui se forment surtout sur les jeunes tiges également comme sur les branches et les brindilles. Les feuilles et les fruits sont rarement infectés, mais ils abritent habituellement la bactérie à la surface en tant que résidents. Olive est considéré comme un problème important pour les cultures d'olives en raison de son effet sur la croissance végétative (déclin de la branche et des pousses, mort de petits branches et brindilles), rendement en olives, et même éventuellement sur la qualité de l'huile d'olive des caractéristiques organoleptiques inférieures telles qu'une odeur désagréable et une amertume, goût ranci (Bouaichi et *al.*, 2019).

## 7. Méthodes de lutte

La tuberculose de l'olivier est difficile à contrôler. La prévention est la seule stratégie fiable. Les applications de matériaux contenant du cuivre pour protéger les cicatrices foliaires ou d'autres blessures minimisent les maladies, mais elles doivent souvent être répétées pour protéger les nouvelles blessures au fur et à mesure qu'elles apparaissent. Un minimum de deux applications est habituellement nécessaire : une à l'automne avant le début des pluies d'hiver, et une autre au printemps lorsque la plupart des feuilles sont excrétées. Le cuivre peut blesser les arbres dans les zones de faibles précipitations. Une taille prudente est utile, pendant la saison sèche, pour éliminer les galles qui sont les sources de l'inoculum bactérien (Sibbett et Ferguson, 2005).

La lutte biologique est une autre alternative au contrôle de la maladie du nœud olive, mais est rarement testée contre le Psv. À ce jour, les agents de lutte biologique ont été évalués à l'aide d'isolats de *P. fluorescens* et des mutants de Psv produisant des bactériocines, mais sans résultats satisfaisants (Krueger et coll., 1999; Varvaro et Martella, 1993). Les bactériocines sont d'excellents candidats à l'utilisation en agriculture pour contrôler les bactéries phytopathogènes en raison de leur spécificité élevée. Une bactériocine produite par *P. syringae* pv. *Il* a été démontré que le *ciccaronei* inhibe la prolifération et la survie de la forme épiphyte du Psv (Lavermicocca et coll., 2002, 2003). L'efficacité des essais avec des oliviers de deux ans dans une chambre de culture a été équivalent à celui de l'hydroxyde de cuivre, bien qu'il serait intéressant d'évaluer son efficacité dans les plantes de pépinière ou de

plein champ et de déterminer leur toxicité et leur persistance avant de conseiller leur enregistrement commercial. (Quesada et *al.*, 2012)

# **Chapitre III : Matériel et méthodes**

L'objectif de cette étude est l'isolement et l'identification des bactéries responsables des tumeurs de l'olivier dans la région de djelfa. Avant de faire l'isolement, le prélèvement des échantillons a été effectué sur des arbres qui présentent les symptômes.

### **1. Prélèvement des échantillons**

A l'aide d'un sécateur désinfecté on a coupé des rameaux présentant des symptômes caractéristiques de la tuberculose de l'olivier dans un verger d'olivier dans la région de Djelfa. Entre chaque prélèvement le sécateur est désinfecté. Chaque galle est conservée dans un sachet en plastique et transporté immédiatement au laboratoire pour l'isolement.

### **2. Technique d'isolement**

L'isolement de la bactérie phytopathogène a été effectué utilisant deux méthodes différentes:

- La première étape consiste en la désinfection des échantillons de tumeurs où la surface des tumeurs est essuyée avec de l'éthanol à 75°. Les tumeurs sont placées dans une zone propre et stérile, cette étape est réalisée avec soin pour garantir une désinfection complète ; ensuite la moitié de la tumeur a été coupée en petits fragments est mise sur le milieu de culture king B.
- La deuxième méthode consiste à broyer la moitié restante de la tumeur dans 1000 µl d'eau distillée stérile puis ensemencement sur milieu de culture King B.

Les boîtes sur les boîtes d'isolement celles des fragments et celles faites par étalement ont mises dans l'étuve à 27 ° pour une incubation de 48 heures.

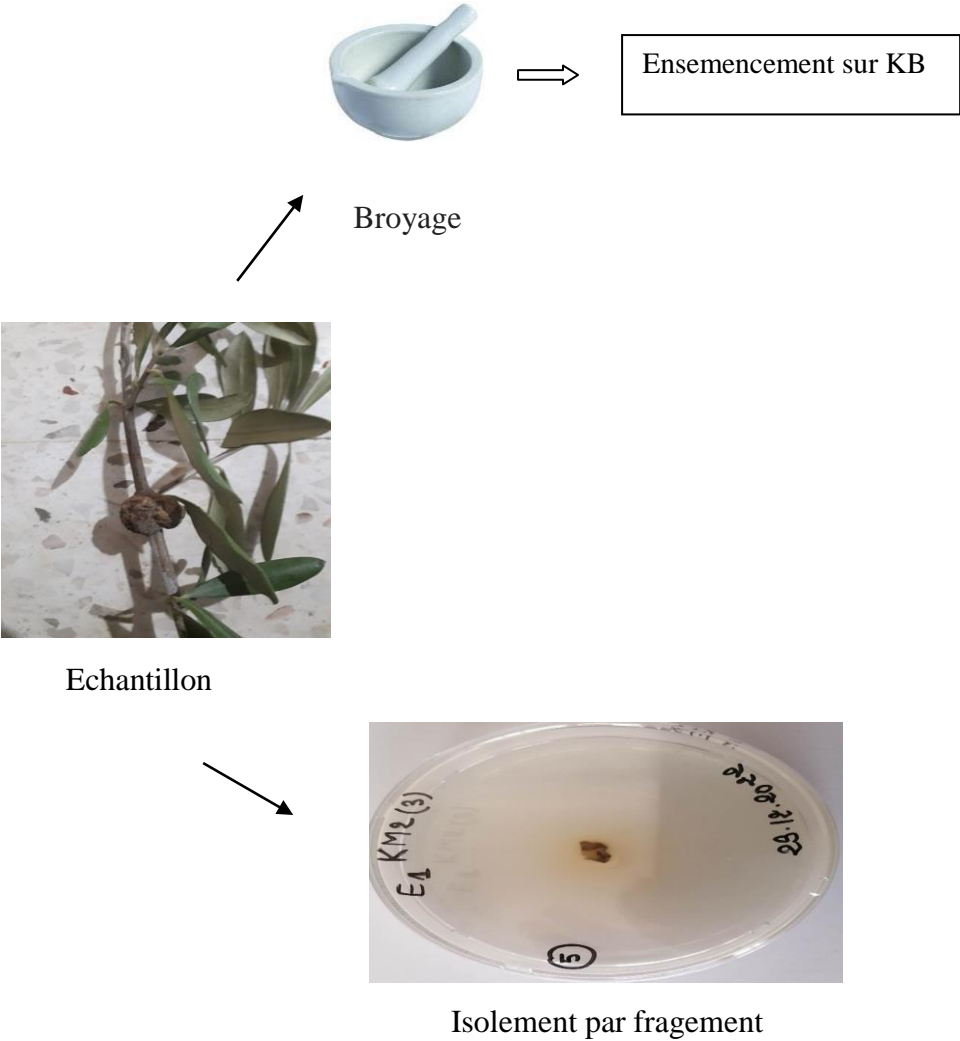


Figure 4 : Protocoles de l'isolement (Original 2023).

### **3. Sélection et purification**

La détermination de la bactérie repose sur l'observation de certaines caractéristiques morphologiques des colonies, qui se distinguent par leur forme régulièrement circulaire, leur surface lisse et brillante, ainsi que leur fluorescence.

La purification a été basée à prendre une colonie spécifique et à l'ensemencer dans trois secteurs différents du milieu King B pour obtenir des nouvelles colonies pures.

#### **4.1. Détermination du genre**

Pour étudier la caractérisation phénotypique des bactéries, les isolats bactériens sont testés pour la coloration de Gram, le métabolisme du glucose et la fluorescence de la colonie (Lelliot *et al.*, 1966)

#### **4.1. Coloration de Gram**

La coloration Gram est l'un des outils les plus importants qu'un microbiologiste peut utiliser pour faciliter l'identification des bactéries pathogènes ou faire la distinction entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. (Gilda et Stanley, 1984)

Pour ce test, nous avons pris une lame propre et sur laquelle nous avons déjà déposé une goutte d'eau distillée stérile par une pipette stérile. Et par une anse stérile nous avons touché le dessus d'une colonie isolée et nous l'avons distribuée dans la goutte d'eau distillée avec des mouvements circulaires. La lame est séchée à l'air puis séchée à la flamme (Gilda et Stanley, 1984)

Technique de la coloration consiste à recouvrir la lame par le violet de gentiane pendant 1 minute puis la rincer avec de l'eau du robinet. Ensuite la lame sera recouverte avec du lugol pendant 1 minute puis rincer puis la rincer avec de l'eau du robinet. Une décoloration à l'alcool 95° sera faite pendant 30 secondes suivies par un rinçage de l'eau du robinet. Une recoloration à fushine pour 10 secondes sera faite en dernier suivi par un rinçage et un séchage à l'air (Lansing *et al.*, 2018).

L'utilisation d'un microscope optique avec un grossissement de 40x permet de différencier les bactéries Gram positives qui apparaissent en violet, des bactéries Gram négatives qui présentent une teinte rose.

#### 4.2. Test KOH

L'essai d'hydroxyde de potassium (KOH) a été mis au point par Gregerson pour distinguer les bâtonnets Gram positifs des bâtonnets Gram négatifs.

Le protocole exige que l'on retire aseptiquement une colonie d'une culture âgée de 48 heures et que l'on l'agite en quelques gouttes d'une solution à 3 % de KOH sur une lame de verre propre et ce, en utilisant une anse de platine stérile. Quelques secondes plus tard, la boucle est soulevée pour observer le fil visqueux attachés à la boucle qui formé par lyse de la paroi cellulaire de bacille Gram-négatives et la libération de l'ADN visqueux. Les bacilles gram-positives ne créent pas de fil visqueux (Clontz, 2008).



**Figure 5 :** Test KOH, (Original, 2023)

#### 4.3. Test de fluorescence

Ce test est utilisé pour la détection de la fluorescéine sur King B, un pigment fluorescent vert ou bleu (Schaad et *al.*, 2001)

Le protocole de ce test consiste à ensemencer des colonies bactériennes sur d'agar King B avec anse de platine stérile dans trois secteurs. Après une période d'incubation de 4 jours, les boîtes de pétri ont été observées sous lampe UV pour la fluorescence à 365 nm. (Moorthy et *al.*, 2020).

#### 4.4. Test Hugh et Liefson

Le test oxydatif-fermentatif détermine si la bactérie métabolise le glucose par des procédés fermentatifs ou oxydatifs (Amita et *al.*, 2018).

Ce test consiste à inoculer deux tubes contenant le milieu Hugh et Liefson par une piqure centrale avec une colonie bactérienne jeune âgée de 48 heures. Ensuite, nous avons ajouté 1,5 ml l'huile de vaseline stérile à un des deux tubes. Les deux tubes sont incubés à la

température de croissance (27°C) pour 2 jours. Nous avons effectué deux lectures une après 24 et une deuxième après 48 heures.

Les bactéries fermentatives peuvent réagir dans les deux tubes, tandis que les bactéries oxydatives ne réagissent que dans le tube ouvert (Laskin, 1986)

## 5.2. Détermination de l'espèce

L'identification de l'espèce a été basée sur le test LOPAT : Levan, Oxydase, Pectinase, présence de L'arginine dihydrolase et hypersensibilité sur les feuilles de Tabac (Lelloitt et *al.*, 1996)

### 5.1. Test levane sucrase

Ce test permet de vérifier la polymérisation du fructose en poly-fructose. (Varma et *al.*, 1991)

Une gélose peptone de saccharose ou une gélose nutritive contenant 5 % de saccharose est un substrat approprié pour le test de Levan. Pour l'essai, une seule colonie de chaque isolat a été ensemencée avec anse de platine sur un milieu Levane. Ensuite, les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 4 jours. (Islam et *al.*, 2013). En cas de prolifération des colonies blanchâtres et convexes présentant une texture crémeuse, cela indique la production de l'enzyme levan-sucrase (Lelloitt et *al.*, 1996) par contre la réaction négative se caractérise par des stries plates et non luisantes.



**Figure 06 :** Test Levane sucrase, (original 2023)

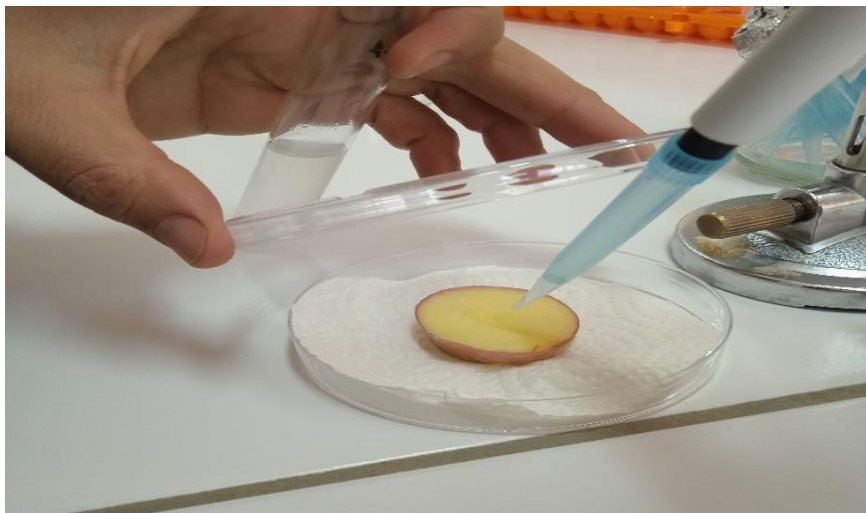
## 5.2. Test Oxydase

Le test oxydase est utilisé pour aider à l'identification des espèces *Pseudomonas*, qui produisent l'enzyme cytochrome oxydase (Cheesbrough, 2006).

Pour ce test, nous avons étalé une colonie jeune âgée de 48 heures sur la petite bandelette à l'aide d'une pipette pasteur stérile. L'apparition en 10 secondes d'une coloration allant de violet à pourpre indique un test positif. Des réactions tardives ou l'absence de couleur indiquent un test négatif (Delarras, 2014).

## 5.3. Test Pectinase

Le test de Pectinase détermine l'activité analytique des bactéries, c.-à-d. leur capacité à décomposer la pectine dans un milieu de culture particulier ou dans des tranches de pommes de terre. Les pommes de terre sont désinfectées à l'éthanol à 75 %, puis lavées à l'eau distillée stérile et séchées. Les pommes de terre ont été coupées en tranches, chacune doit être placée dans une boîte de Petri contenant du papier filtre stérile humide. 100  $\mu$ l de d'une suspension bactérienne jeune a été injecté dans un trou au centre de la tranche. Les boîtes ont été incubées à 27° C pendant sept à quatorze jours. L'odeur indésirable et l'apparition de nécrose signifie la présence de l'enzyme pectinase (Hamid et al., 2017).



**Figure 07:** Test de pectinase, (original 2023)

#### 5.4. Test Arginine di hydrolase (ADH)

Le principe de ce test c'est hydrolyse l'acide aminé arginine dans des conditions relativement anaérobies à l'ornithine et à l'ammoniac, donnant une réaction alcaline. Il est utilisé pour différencier certains types d'aérobies à Gram négatif, en particulier *Pseudomonas* (Dart, 1996). Une nouvelle culture a été introduite dans deux tubes d'agar doux du milieu de Thornley, scellée avec de l'huile minérale stérilisée (huile de vaseline). Un changement de couleur de rose fade à jaune dans les quatre jours est une réaction positive (Islam *et al.*, 2013). S'il n'y a pas de changement de couleur, cela indique que la réaction est négative.



**Figure.08** : Technique d'ensemencement dans le test Arginine, (original 2023)

#### 5.5. Test d'hypersensibilité-sur tabac

Le test d'hypersensibilité du tabac; il révèle généralement la pathogénicité ou non d'une souche bactérienne. (Ameur *et al.*, 2017)

Pour la réalisation de ce test, nous avons injecté un volume de 1 ml d'une suspension bactérienne dense dans le mésophylle d'une feuille de tabac. Une bactérie pathogène provoquera une réaction hypersensible (HR) : les cellules fuient et s'effondrent dans les 24 heures suivant l'infiltration, rendant le tissu vitreux, puis nécrotique. L'infiltration avec des non-pathogènes ne provoque qu'un jaunissement après plusieurs jours ou aucune réaction. (Janse, 2006).



**Figure 09 :** Test hypersensibilité sur tabac, (original 2023)

# **Chapitre IV : Résultats et Discussion**

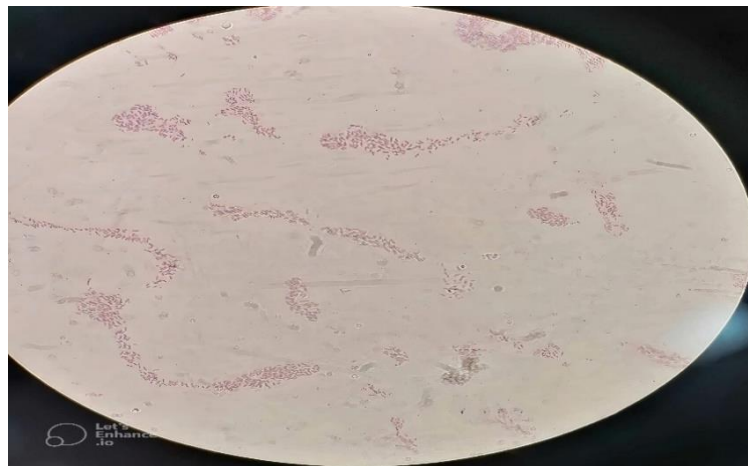
## 1. Isolement

Le protocole d'isolement utilisé nous a permis d'obtenir de bactéries semblables à celle de *Pseudomonas savastanoi* au bout de trois jours, les colonies obtenues sur King B étaient beige circulaires (Surico et Marchi, 2003). Ces isolats ont été purifiés pour leur identification.

## 2. Test de gram

Les résultats du test de coloration du Gram étaient négatifs car nous avons obtenu du rose dans 25 isolats indiquant que les bactéries sont des bacilles de type gram négatif.

La paroi bactérienne gram-négative est caractérisée par une membrane mince de peptidoglycane qui à son tour permet la pénétration de l'alcool conduisant à la décoloration de la cellule et l'élimination de la couleur violette de la paroi et recoloré par la fuchine (Ghuysen et Hakenbeck, 1994).

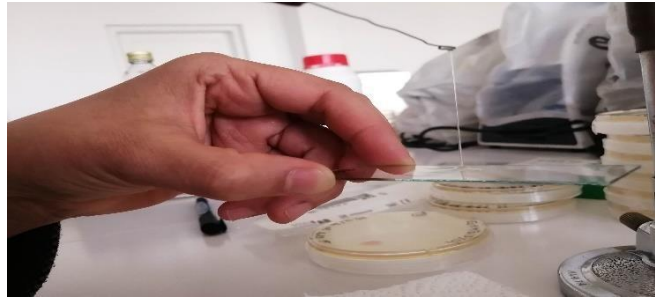


**Figure 10** : Résultat de coloration de Gram, (original 2023)

## 3. Test KOH

Après cette expérience, tous les 25 isolats que nous avons étudiés donnent le fil, ce qui signifie qu'ils sont des Gram (-). Ce test nous permet de distinguer les bactéries gram-positives des bactéries gram-négatives et confirme les résultats de coloration de Gram.

Le test KOH est basé sur des différences dans la composition chimique de la paroi cellulaire bactérienne. La paroi cellulaire des bactéries gram-négatives est facilement perturbée lors de l'exposition à des solutions alcalines diluées. Lorsque les parois cellulaires sont perturbées, la suspension dans le KOH devient visqueuse en raison de la libération de fil relativement non fragmentés d'acide désoxyribonucléique (Gilda et Stanley, 1984).



**Figure 11:** Résultat de test KoH, (original 2023)

#### 4. Test de fluorescence

Après 4 jours d'incubation, les boîtes de pétri ont été observées sous lampe-UV à 365 nm, chez les 25 isolats nous avons observé un pigment jaune-vert fluorescent ce qui indique que la bactérie a produit la pyoverdine.

La détection du pigment jaune-vert à l'aide du milieu King B est rapidement devenue l'un des critères taxonomiques les plus importants de reconnaissance des *Pseudomonas*. La couleur et la fluorescence dans la lumière UV de ces composés ont facilité la recherche visant à comprendre leur importance physiologique et les conditions de production. Parmi les autres facteurs de croissance nutritionnels susceptibles d'influencer la biosynthèse de la pyoverdine figurent la nature et la concentration des sources de carbone et d'azote, le degré d'aération des milieux de croissance, la présence de  $Mg^{++}$  ou de  $Zn^{++}$ . Mais le niveau de fer dans le milieu de croissance a pris une place importante (Swinburne, 2012).

#### 5. Test Hugh et Leifson

Nous avons obtenu les résultats finaux de ce test est que tous les 25 isolats ont eu des résultats positifs dans la surface des tubes (jaunissement de la surface moyenne) tandis que les tubes du milieu avec de l'huile a eu des résultats complètement négatifs.

Ce test de Hugh et Leifson nous révèle la différence entre l'oxydation et la fermentation des bactéries par le détecteur de couleur Blue de Bromothymole. Après avoir fait ce test, nous avons obtenu le jaunissement dans le tube (sans huile) tandis que l'autre tube (avec huile) reste intact après 48 heures, indiquant que la réaction de l'attaque de glucose s'est produite en présence d'oxygène, ou par voie oxydative (Amita et *al.*, 2018).

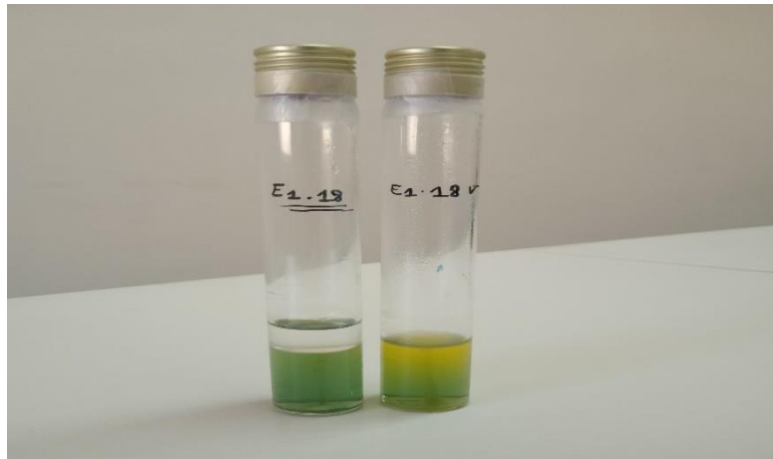


Figure 12 : Résultat de test Hugh et Leifson, (original 2023)

Tableau n°3 : Résultats d'identification le genre

Code	Coloration de gram	KoH	fluorescent	Hugh et Leifson			
				Après 24 heures		Après 48 heures	
				Sans huile	Avec huile	Sans huile	Avec huile
E1.1	-	-	F	+ -	- -	+ -	- -
E1.2	-	-	F	+ -	- -	+ -	- -
E1.3	-	-	F	+ -	- -	+ -	- -
E1.4	-	-	F	+ -	- -	+ -	- -
E1.5	-	-	F	+ -	- -	+ -	- -
E1.6	-	-	F	+ -	- -	+ -	- -
E1.7	-	-	F	+ -	- -	+ -	- -
E1.8	-	-	F	+ -	- -	+ -	- -
E1.9	-	-	F	+ -	- -	+ -	- -
E1.10	-	-	F	+ -	- -	+ -	- -

E1.23	-	-	F	+	-	+	-
				-	-	-	-
E1.12	-	-	F	+	-	+	-
				-	-	-	-
E1.13	-	-	F	+	-	+	-
				-	-	-	-
E1.15	-	-	F	+	-	+	-
				-	-	-	-
E1.17	-	-	F	+	-	+	-
				-	-	-	-
E1.20	-	-	F	+	-	+	-
				-	-	-	-
E1.21	-	-	F	+	-	+	-
				-	-	-	-
E1.24	-	-	F	+	-	+	-
				-	-	-	-
E1.19	-	-	F	+	-	+	-
				-	-	-	-
E1.37	-	-	F	+	-	+	-
				-	-	-	-
E1.40	-	-	F	+	-	+	-
				-	-	-	-
E1.42	-	-	F	+	-	+	-
				-	-	-	-
E1.51	-	-	F	+	-	+	-
				-	-	-	-
E1.52	-	-	F	+	-	+	-
				-	-	-	-
E1.57	-	-	F	+	-	+	-
				-	-	-	-

Les résultats des tests biochimiques pour les 25 isolats sont forme bacilles Gram négative, fluorescent sur King B et aérobic strict.

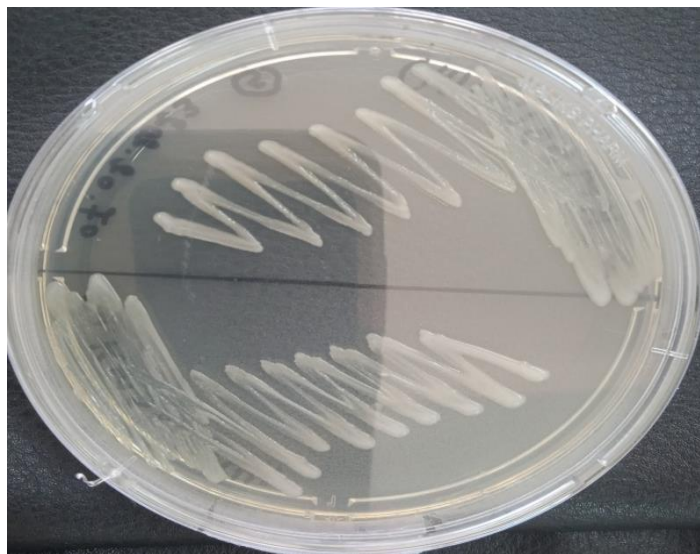
## 6. Test LOPAT

### 6.1. Test Levanesucrase

Dans ce test, après 4 jours d'incubation, tous les 25 isolats ont montré une réaction négative, indiquant ainsi l'absence de l'enzyme levanesucrase.

Dans la nature, les lévanes sont produites à partir du saccharose par l'enzyme lévanesucrase (SL), principalement produite par les bactéries. L'enzyme SL stimule le transfert du groupe fructosyle du saccharose vers une molécule accepteur. Dans cette réaction enzymatique, le lien glucosidique du saccharose est rompu, ce qui conduit à la formation de glucose. Ensuite, le groupe fructosyle est transféré de l'enzyme vers une molécule accepteur, où deux types de réactions peuvent se produire.

La réaction de transfert de fructosyle se produit lorsque le destinataire est le saccharose, le fructose, le glucose ou une chaîne de croissance lévane. Cependant, si la molécule accepteur est une molécule d'eau, l'enzyme libère le fructose, complétant ainsi la réaction de dégradation du saccharose (Carbajal et *al.*, 2020)



**Figure 13:** Résultat de test levane sucrose , (original 2023)

## 6.2. Test oxydas

D'après notre essai d'oxydase, les 25 isolats testés n'ont donné aucune couleur et donc nous concluons que des bactéries n'utilisent pas le cytochrome oxydase. Dans l'essai d'oxydase, les dérivés p-phénylènediamine utilisés comme réactifs sont oxydés en composés colorés par cytochrome oxydé c, qui à son tour change en cytochrome réduit c. En conséquence, le réactif d'essai agit comme donneur d'électrons artificiels et ne réagit pas directement avec l'enzyme (Grigorova, 1987).

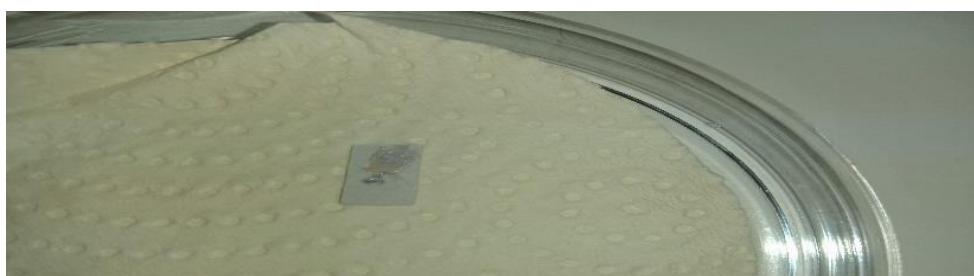


Figure 14: Résultat de test oxydase (Original, 2023).

## 6.3. Test pectinase

Après 14 jours d'incubation, les résultats de ce test ont montré que les 23 souches isolats ont pas réagi positivement, ce qui indique que la bactérie n'avait pas le capacité de dégrader la pectine. Par contre, chez deux isolats (E1.8 et E1.19), nous avons observé une pourriture ce qui indique une réaction positive.

Les enzymes pectinolytiques sont un groupe d'enzymes apparentées qui hydrolysent les substances pectiques. La pectine est un polysaccharide complexe présent dans la lamelle moyenne des parois cellulaires végétales. Il est composé de plusieurs unités d'acide D-galacturonique liées par une liaison glycosidique  $\alpha$  (1, 4). Des enzymes pectinolytiques ont été signalées chez des plantes et des microorganismes supérieurs, y compris des bactéries et des champignons. La pectine est complètement digérée par trois enzymes majeures : la pectine méthylestérase, la pectinase (polygalacturonase; et la pectine lyase pour libérer les acides galacturoniques et ses oligomères (Patidar et *al.*, 2018)



**Figure 15** : Résultat de test pectinase (Original, 2023).

#### 6.4. Test arginine dihydrolase

Les résultats de ce test sont apparus après 4 jours d'incubation, aucun changement n'a été observé chez tous les isolats testés, ce qui indique que les 25 isolats ne sont pas capables de produire l'enzyme arginine dihydrolase.

L'arginine, est un acide aminé, peut être catabolisé en ornithine par une réaction enzymatique qui produit de l'ATP et du  $\text{NH}_3$ . La voie est généralement appelée "dihydrolase d'arginine" parce qu'elle implique deux enzymes qui produisent L-citrulline (arginine desminase) puis ornithine (ornithine carbamoyltransférase) (Duveiller, 1997) .



**Figure 16** : Résultat de test Arginine dihydrolase (original, 2023).

### 6.5. Test d'hypersensibilité-sur tabac

Dans ce test, en raison de non disponibilité des plantules de tabac, nous avons effectué le test d'hypersensibilité pour 7 isolats uniquement. Après 24 heures nous avons observé un dessèchement dans toutes les zones injectées ce qui indique que les bactéries sont pathogènes.

Un grand pourcentage d'agents pathogènes végétaux sont des biotrophes qui nécessitent des composés provenant des cellules hôtes vivantes. La reconnaissance de l'attaque d'agents pathogènes déclenche une réaction d'hypersensibilité (HR) dans la plante, qui comprend l'induction d'intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROI) et la mort cellulaire locale. HR est considérée comme l'un des facteurs les plus importants pour entraver la croissance des agents pathogènes bio-trophiques. Cela n'exclut pas que les RH jouent un rôle important dans la résistance (Govrine et Levine 2000). La production des formes réactives de l'oxygène (ROS) et de l'oxyde nitrique (NO) se produisent habituellement très tôt dans la réponse de défense et sont souvent importants pour le déclenchement de la HR. D'autres caractéristiques couramment décrites incluent la peroxydation lipidique, la reprogrammation transcriptionnelle, les flux d'ions et l'enrichissement de la paroi cellulaire (Balint-Kurti, 2019)



**Figure 17:** Résultat de test Hypersensibilité sur tabac (Original, 2023).

**Tableau n°4 : Résultats d'identification l'espèce**

Code	Levane	Oxydase	Pomme de terre	Arginine		Tabac
E1.1	-	-	-	-	-	Nd
E1.2	-	-	-	-	-	Nd
E1.3	-	-	-	-	-	Nd
E1.4	-	-	-	-	-	Nd
E1.5	-	-	-	-	-	Nd
E1.6	-	-	-	-	-	Nd
E1.7	-	-	-	-	-	Nd
E1.8	-	-	+	-	-	Nd
E1.9	-	-	-	-	-	+
E1.10	-	-	-	-	-	+
E1.23	-	-	-	-	-	Nd

E1.12	-	-	-	-	-	Nd
E1.13	-	-	-	-	-	Nd
E1.15	-	-	-	-	-	Nd
E1.17	-	-	-	-	-	Nd
E1.20	-	-	-	-	-	Nd
E1.21	-	-	-	-	-	Nd
E1.24	-	-	-	-	-	+
E1.19	-	-	+	-	-	Nd
E1.37	-	-	-	-	-	Nd
E1.40	-	-	-	-	-	Nd
E1.42	-	-	-	-	-	+
E1.51	-	-	-	-	-	+
E1.52	-	-	-	-	-	+
E1.57	-	-	-	-	-	+

Les résultats de test LOPAT pour les 25 isolats sont Levane négative, Oxydase négative, 23 isolats sont des pectinase négatif, Arginine dihydrolase négative et 7 isolats sont pathogènes.

**7. Discussion**

L'objectif de cette étude est d'isoler et d'identifier l'agent causal de la maladie de tuberculose de l'olivier, pour cela nous avons initialement, isolé les bactéries utilisant deux méthodes une par étalement sur milieu de culture King B et une autre en coupant les tumeurs et en les plaçant sur milieu King B, après 48 heures, nous avons observé l'apparition des colonies bactériennes dans les boîtes d'isolement, cette méthode a été fortement adoptée pour isoler les champignons mais n'empêche pas l'utilisation de cette méthode pour isoler les bactéries (Saiah et *al.*, 2011).

Après l'isolement et la purification, nous avons sélectionné 25 isolats à étudier par un ensemble des tests biochimiques (Coloration de Gram, Test KoH, Test de fluorescent, Test Hugh & Leifson).

La coloration de Gram est une méthode pour différencier les espèces bactériennes en deux grands groupes, Gram positif et Gram négatif, en fonction des propriétés chimiques et physiques de leur paroi cellulaire. Les résultats de ce test indiquent que les 25 isolats testés sont des gram négative avec forme bacilles. Les bactéries Gram négatifs se caractérisent par une paroi cellulaire composée d'une couche mince de peptidoglycane et une membrane externe contenant des lipo-polysaccharides, ces lipides sont éliminés par l'étape de lavage à l'alcool. Les bactéries Gram-négatives perdent ainsi leur couleur violette et apparaissent roses lorsqu'elles sont recolorées par la fushine (Sufa et *al.*, 2023). Les résultats de coloration de Gram est confirmé les résultats de test KoH, dans ce test la réaction a été positive pour 25 isolats. KOH est rendu collant par des mécanismes gram-négatifs en raison de la destruction de la paroi cellulaire et la libération d'ADN collant (Clontz, 1997). Les résultats du test de gram concordent avec beaucoup de travaux à savoir ceux menés par Doksöz et Bozkurt (2020), selon ces auteurs, les isolats des tumeurs de l'olivier sont de type Gram négatif.

Le test de production de pigment fluorescent sur King B permet de détecter la présence la fluorescence chez des *Pseudomonas*. Les 25 isolats dans ce test ont été fluorescentes. La fluorescence est un caractère phénotypique facile à observer, et assez important puisqu'il concerne environ la moitié des espèces de *Pseudomonas*, il se base sur la production de pyoverdine, le pigment jaune-vert hydrosoluble et fluorescent précédemment appelé fluorescéine, produit par les *Pseudomonas* fluorescentes. Ce pigment est observable lors de la croissance des bactéries sur le milieu de King B où sa production entraîne l'apparition d'une

fluorescence brillante dans le milieu (Dion et Nautiyal, 2008). Selon Hijazin et Khalif,(2005) les isolats des tumeurs d'olivier sont fluorescentes

Pour le test de Hugh et Leifson, 25 isolats attaquent le glucose en présence d'oxygène, donnant un changement de couleur du tube ouvert (sans huile) au jaune ~~sur la surface~~ indiquant que les bactéries sont aérobies strictes. Dans la réaction d'oxydation, de l'acide est produit. Cela modifie le pH du milieu, qui peut être détecté par le bleu bromothymole (Tille., 2013). Selon Alabdalla *et al.*, (2009), les bactéries causant la maladie des tumeurs d'olivier dans les fermes oléicoles en Syrie ont un métabolisme oxydatif non fermentatif.

Les caractéristiques des isolats ont été étudiés par des tests appelés LOPAT (Levane ; Oxydase ; Pectinase ; Arginine dihydrolase ; hypersensibilité sur Tabac).

Dans le test Levane les résultats étaient négatifs pour les 25 isolats, chez les levanes positives l'enzyme levanesucrase fonctionne en catalysant la conversion du saccharose en levane via la réaction de fructosyltransférase (Pongtorn *et al.*, 2022). Selon Mirik et Bitgen, (2021) les isolats obtenus de l'olivier de sont des levanes négatif et cela , concorde avec nos résultats de ce test. D'autre part Elamri *et al .*, (2019) et Hassuna *et al .*, ( 2022) signalent que certains résultats positifs sont apparus dans le test levane.

Le test oxydase vise à déterminer si les bactéries sont capables d'utiliser une enzyme cytochrome C respiratoire. Pour ce test, 25 isolats ont donné une réaction négative ce qui indique que la bactérie n'a pas l'enzyme cytochrome C., La réaction positive due à oxydation de la tétraméthylphényldémine montre la présence d'enzyme respiratoire cytochrome C. Le test est particulièrement utile pour identifier les *pseudomonas* (Jacob, 2005). Selon Hamed., *et al* (2022) les isolats d'olivier sont des oxydases négatives.

Dans le test pectinase, les 23 isolats ont donné une réaction négative et n'ont montré aucune pourriture sur les tranches de pomme de terre, et 2 isolats ont donné une réaction positive. Les pectinases sont des enzymes qui hydrolysent la pectine du tissu de la plante hôte et jouent un rôle important dans le développement de la pourriture molle. Ces enzymes produites par des bactéries causa la pourriture molle comme dans le cas d'*Erwinia carotovora* et des champignons comme *Rhizopus* qui dégradent la lamelle moyenne, détachent les cellules les unes des autres. Dans le cas de la pourriture molle bactérienne, l'action pathogène est en fait provoquée par la diffusion des enzymes par les bactéries (Bhat et al., 2012). D'après Koščak et al., (2023) les isolats d'olivier dans trois pays européens (Croatie, Slovénie et Portugal) ont une activité pectinolytique négative. Mirik et Aysan, (2012), ont signalé que les isolats d'olivier étudiés sont des pectinases négative.

Le test arginine détermine si l'enzyme arginine dihydrolase est présent ou non (Lacey et kaya, 2000). Les résultats de ce test indiquent que les 25 isolats n'ont pas l'enzyme arginine dihydrolase. Cet enzyme décompose l'acide aminé arginine en Ornithine et en Ammoniac dans des conditions relativement anaérobie, ce qui entraîne une réaction alcaline. Elle est employée pour différencier certains types de bactéries aérobies à Gram négatif, notamment les *Pseudomonas* (Dart, 1996). Selon Doksöz et Bozkurt (2020), les isolats bactériens isolés à partir des tumeurs d'olivier en Turquie étaient des arginine négatifs. De leur côté Hijazin et Khlaif (2005) ont rapporté que des *Pseudomonas isolées* d'olivier sont également des arginine négatifs.

Dans le test d'hypersensibilité sur le tabac, tous les 7 isolats ont donné une réaction positive. La réaction d'hypersensibilité (HR) est une forme de mort cellulaire programmée au site de l'infection, qui est pensée pour mettre en quarantaine les agents pathogènes biotrophiques au site de l'entrée de l'agent pathogène et ainsi empêcher la propagation vers l'extérieur vers les tissus sains. Cependant, la nécrose associée à la HR n'est pas efficace pour contenir les agents pathogènes nécrotrophes, ce type de résistance n'est donc activé que contre les agents pathogènes biotrophiques ou héli-biotrophes (Chakraborty et al., 2017). Comme mentionné par Martínez et al., (2010), les isolats d'olivier donne une réaction positive .

# **Conclusion**

## Conclusion

---

### Conclusion

La maladie de la tuberculose de l'olivier, causée par la bactérie *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, affecte gravement les oliviers (*Olea europaea* L.) Principalement dans les pays méditerranéens, où les conditions climatiques favorisent souvent la propagation de la maladie. Les symptômes de la maladie sont caractérisés par des excroissances tumorales sur différentes parties des plantes infectées, principalement des pousses et des branches. Le développement de ces galles dépend de la production bactérienne de l'acide indoleacétique phyto-hormone et des cytokinines (Comai et Kosuge, 1980).

L'objectif de ce travail est isolement et identification de l'agent responsable de la maladie tuberculose de l'olivier dans la région de djelfa

Après avoir effectué l'isolement et la purification, 25 isolats ont été sélectionnés pour déterminer le genre des bactéries à l'aide de plusieurs tests. Ces tests comprenaient la coloration de Gram, le test KoH, le test Hugh et Leifson, ainsi que le test de fluorescence sur milieu King B. Sur la base des résultats de ces tests, les bactéries ont été identifiées comme des bacilles à Gram négatif, fluorescent. De plus, leur capacité à métaboliser le glucose par oxydation a été confirmée.

Dans le cadre du test LOPAT visant à déterminer l'espèce d'isolats bactériens, les résultats ont montré que ces isolats étaient caractérisés comme suit : ce sont des bactéries Levane négatif, elles sont également négatives au test d'oxydase, incapables de dégrader la pectine (résultat négatif au test de pectinolyse), et elles présentent une réaction négative au test d'arginine dihydrolase. De plus, parmi les 7 isolats étudiés, ils ont affiché une sensibilité excessive (bactérie sont pathogène).

Face aux défis auxquels sont confrontés les producteurs d'olives en raison des pertes causées par la bactérie des tumeurs de l'olivier et en l'absence d'un traitement définitif pour cette maladie, il est impératif de progresser dans ce domaine. L'un des facteurs clés pour réduire la propagation de cette maladie est l'étude approfondie de la façon dont les bactéries fonctionnent, ainsi que la sensibilisation des agriculteurs à l'importance des pratiques préventives et au développement de variétés d'oliviers résistantes à la galle de l'olivier.

Selon les résultats de notre étude, il est avantageux d'utiliser des techniques modernes telles que l'analyse moléculaire et la génomique pour améliorer le diagnostic des maladies et développer des stratégies de lutte plus précises.

# **Références bibliographiques**

## Reference bibliographique

---

### Référence :

**Alabdallaa N, Valentinia F., Morettib C, Essac S, Buonaurob R , Abu-Ghorra M** (2009). First report of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* causing olive knot in Syria. 58, 1170

**Alabdallaa N. , Valentinia F. , Morettib C., Essac S. , Buonaurob R. , Abu-Ghorra M** (2009). First report of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* causing olive knot in Syria. Plant Pathology. 58, 1170. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02109.x

**Alloum, D.** (1974). L'oléiculture algérienne, Options méditerranéennes n°24, 45-48p.

**Ameur A , Rhallabi N, Doussomo M E, Benbouazza1 A, Ennaji M, Achbani E.** (2017). Selection and efficacy biocontrol agents in vitro against fire blight (*Erwinia amylovora*) of the rosacea. Volume: 04 Issue: 12.

**Amita J, Jyotsna A, Vimala V** (2018). Microbiology Practical Manual, 1st Edition-E-book. 600 p,

**Andrea G. F, Bartolini G, Lambardi M, Kailis S** (2004). Olive Propagation Manual. pages 8-10

**Bardoulat M** · (2004). L'olivier, trésor de santé. Pages 95

**Bartolini G, Petruccelli R** (2002). Classification, origin, diffusion and history of the olive. Pages 74.

**Besnard G , El Bakkali A , Haouane H , Baali C.D , Moukhli .A , Khadar B** (2013). Population genetics of Mediterranean and Saharan olives: geographic patterns of differentiation and evidence for early generations of admixture. Ann Bot 112: 1293–1302

**Besnard G, Rubio de Casas R, Christin PA et Vargas P** (2009) Phylogenetics of *Olea* (*Oleaceae*) based on plastid and nuclear ribosomal DNA sequences: tertiary climatic shifts and lineage differentiation times. Ann Bot 104:143–160

**Bhat K. A , Bhat N. A., Mohiddin F. A., . Sheikh P. A , Wani A. H.** (2012). Studies on pectinase activities of isolates of *Erwinia carotovora* and *Rhizopus* sp. causing soft rot in cabbage (*Brassica oleracea* var *capitata* L.). Vol. 7(45), pp. 6062-6067.

## Reference bibliographique

---

**BİTGEN E, MİRİK M** (2021). Tekirdağ ilinde yetişen zeytin ağaçlarında dal kanseri hastalığı etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin tanısı ve antagonist bakteriyel izolatlar ile biyolojik mücadelesi. 26(2) : 326-336. DOI: 10.37908/mkutbd.881977

**Cheesbrough M** (2006). District Laboratory Practice in Tropical Countries. Second edition. Pages 435.

**Cinellia T , Marchia G , Cimminob A , Marongiuc R, Evidenteb A , Fiori M** (2014). Heterogeneity of *Pseudomonas savastanoi* populations infecting *Myrtus communis* in Sardinia (Italy). 63, 277–289. Doi: 10.1111/ppa.12096

**Clontz L.** (2008). Microbial Limit and Bioburden Tests. Validation Approaches and Global Requirements, Second Edition. Pages 280.

**Comai, L., and Kosuge, T** (1980). Involvement of plasmid deoxyribo-nucleic acid in indoleacetic acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*. J. Bacteriol. 143:950-957.

**Dart R K**(1996). Microbiology for the Analytical Chemist. Royal Society of Chemistry, Information Services. Pages 159

**Degrully L, Flahault C** (1907). L'olivier. Pages 223

**Delarras C** (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire ? Recherche de bactéries et delevures-moisissures ; édition : Céline poiteaux, pages 772.

**Dian P , Nutiyal C S** (2008). Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence. Pp 483

**Doksöz S F, Bozkurt A** (2020). Hatay İli Zeytin Üretim Alanlarında Zeytin Dal Kanseri (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) Hastalığının Belirlenmesi

**Duveiller E, Rudolph K.P** (1997). The Bacterial Diseases of Wheat. Concepts and Methods of Disease Management. Pages 78

**Elamri N , Elmagdub. F E, Abughania A M** (2019). Plasmid Profiles of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. doi: 10.36602/jmuas.2019.v01.01.28

**Fabbri G A, Bartolini G, Lambardi M, Kailis S** (2004). Olive Propagation Manual. CSIRO. Pages 141.

## Reference bibliographique

---

**FAOSTATS**, (2019). Food and Agricultural Organization.  
<http://www.fao.org/faostat/fr/#dat>

**Fereidoon S, Apostolos K** (2017) Olives and Olive Oil as Functional Foods: Bioactivity, Chemistry and Processing, First Edition. Pages: 688.  
<https://doi.org/10.1002/9781119135340.ch1>

**Ghuysen J. M , Hakenbeck R** (1994). Bacterial Cell Wall. Volume 27. Pages 580

**Gilda L. J, Stanley M. D** (1984). The Gram Stain. A New Look at an Old Tool. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control. pages 70

**Goussous S J, Al-Gharaibeh M A** (2008). Isolation, Characterization and PCR Tests of the Causal Agent of the Olive Knot Disease (*Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*) in North Jordan. Jordan Journal of Agricultural Sciences, Volume 4.

**Govrine E M , Levine A** (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Voll0. pp751-755*

**Grigorova R. Grigorova R. R** (1987). Methods in Microbiology. Volume 19. Pages 518

**Hamed S, Dr. M- Al joudah, Dr. M, Abo Gherra** (2020). Molecular characterization of *Pseudomonas Savastanoi pv. Savastanoi* isolated from *Myrtus communis* L. (38) :4

**Hamid S, Chergui Z, Ouchefoun I, Halouan F** (2017). Diagnostique de la tuberculose de l'olivier dans la région centre (wilaya de Bouira). The 1st International Congress On Biotechnologies for Sustainable Development- CIBSDD

**Howell Ewing W, Davis B.R** (1974).Me

**Innocenzo M.** (2012). Olive Germplasm. The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy. Pages 386

**Ioannis N T.**(2009). Olives. Pages 425

**Islam S.I.A., Islam M.R., Dastogeer K.M.G, et Hossain I** (2013). Characterization of Leaf Blight Pathogen, *Pseudomonas syringaepv. syringae* of mango in Bangladesh. Vol. 2(6), pages 39-45

**Janse D. J** (2006). Phyto bacteriology. CABI Publishing is a division of CAB international. Pages 360

## Reference bibliographique

---

**Jones G L, Dever S M** (1984). The Gram Stain. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control. Pages 70.

**Kailis S, Harris D J** (2007). Producing Table Olives. Landlinks Press. Pages 328

**Kaniewski D, Campo E V, Boiy T, Terral J F, Khadari B, Besnard G** (2012). Primary domestication and early uses of the emblematic olive tree: palaeobotanical, historical and molecular evidence from the Middle East. **Volume 87**. Pages 885-899.

**Kurti P B.** (2019). The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. 20(8): 1163–1178. doi: 10.1111/mpp.12821

**Laskin A. L** (1986). Advances in Applied Microbiology. Volume 31. pages 370

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

**MIRIKa M, AYSANb Y** (2010). Marmara Bölgesinde Zeytin Dal Kanseri Hastalığının Yaygınlığı ve *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* İzolatlarının Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyonu. 279-290

**Moorthy I. G , Pugazhendhi A , Sivasubramanian V** (2020). Sustainable Development in Energy and Environment . ED Springer Nature Singapore. Pp 246

**Moretti. C, Ferrante P, Hosni T, Valentini F, Onghia A, Fatmi M, Buonauro R.** (2008). Characterization of *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* Strains Collected from Olive Trees in Different Countries. DOI : 10.1007/978-1-4020-6901-7\_33

**Muzzalupo I, Micali S** (2015). Agricultural and Food Biotechnologies of *Olea europaea* and Stone Fruits. Bentham Science Publishers . pages 363

## Reference bibliographique

---

**Nadine A , Elodie C, Tavoillot J , Thierry M.**(2014) Plant-parasitic nematodes associated with olive tree (*Olea europaea* L.) with a focus on the Mediterranean Basin: A review. Volume 337, Issues 7–8. Pages 423-442. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2014.05.006>

**Patidar M K, Nighojkar S, Kumar A, Nighojkar A** (2018). Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: a review. **8(4): 199**. doi: **10.1007/s13205-018-1220-4** Soares M.C.N.; Silva R; Gomes E (1998). Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. 30(4). <https://doi.org/10.1590/S0001-37141999000400002>

**Pongtorn P , Nattapong T, Tanawat R, Nuttinee T, Gary A.L, Witawat J** (2022). Characterization of levansucrase produced by novel *Bacillus siamensis* and optimization of culture condition for levan biosynthesis. v.8(12) : e12137. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e12137

**Prescott M L, Joanne M W, Sherwood L, Woolverton CJ** · (2018). Microbiologie de Prescott. Pages 980

**Purshotam K , Abhishek C** (2009), Cyanobacteria antibacterial activity . New India Publishing Agency. Pages 214.

**Quesadaa J. M, Penyalvera. R, Pérez-Panades. J, Salcedoa C. I., Carbonellb E. A, Lopeza M. M** (2010). Dissemination of *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* populations and subsequent appearance of olive knot disease.(59), 262–269

**Rai M ; Polizeli M.T.M** (2013). Fungal Enzymes. CRC Press. Pages 464

**Rakan H , Hamid K** (2005). Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* from Olive and Other Hosts by Polymerase Chain Reaction (PCR). Volume 32, No. 1.

**Sufa H I, Kumiati L, Dermarwan A, Sumbiring F** (2023). Efficient Techniques for Identifying Gram-Positive Clinical Bacteria. Penerbit NEM. Pages 138.

**Suslow T. V, Schroth M. N., Isaka M** (1982). Application of a Rapid Method for Gram Differentiation of Plant Pathogenic and Saprophytic Bacteria Without Staining. Vol 72

**Swinburne T. R.** (2012). Iron, Siderophores, and Plant Diseases. Springer US. Pp 351

**Tille P M** (2013). Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. Elsevier Health Sciences. Pages 1184

## **Reference bibliographique**

---

**Varma A. K., Read D. J., Norris J.R** (1991). Methods in microbiology. Techniques for the study of mycorrhiza. Pages 512

**Yoda H, Yamaguchi Y, Sano H** (2003). Induction of Hypersensitive Cell Death by Hydrogen Peroxide Produced through Polyamine Degradation in Tobacco Plants. 132(4):1973–1981. doi: 10.1104/pp.103.024737.

# **Annexe**

## Composition des milieux cultures :

### 1-Milieux de culture (g/l)

#### King B :

Mélange de peptone.....	20.0g/l
Phosphate dipotassique... ..	1.5g/l
Sulfate de magnésium .....	1.5g/l
Agar bactériologique... ..	14.0g/l
PH final : 7 et 7.5 à 27°C	

#### Hugh et Leifson

Peptone... ..	02g
Chlorure de sodium... ..	05g
Hydrogénophosphate de potassium.....	0,3g
Glucose.....	10g
Bleu de bromothymol.....	0,03g
Eau distillée.....	1L
PH = 7,2	

#### Levane :

Extrait de levure .....	2g/l
Peptone... ..	5g/l
Na Cl.....	5g/l
Saccharose .....	50g/l
Gélose... ..	20g/l
Eau distillée.....	1L
Ph : 7.0-7.2.	

#### Arginine :

Peptone .....	1g/l
Sodium chloride .....	5 g/l
Dipotassium hydrogen phosph... ..	0.3g/l
L-Arginine.....	10. g/l
Rouge de phenol.....	0.016g/l
Agar... ..	3. 0g/l
Eau distillée.....	1l