

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahleb Blida 1 (USDB-1)
Faculté des Sciences de la Nature et de La Vie
Département de Biotechnologie et Agro-écologie



THESE

En vue de l'obtention du **diplôme** de

Doctorat 3^{ème} Cycle LMD

En : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

***Recherche sur le potentiel insecticide des entomopathogènes
associés aux citrus***

Présenté par

M^r HAFSA Mohamed

Devant le jury :

M^{me} MOUMENE-MESSGO Saïda

Professeur à Univ.Blida 1

Présidente

M^{me} ALLAL-BENFEKIH Leila

Professeur à Univ.Blida 1

Directrice de thèse

M^{me} OULEBSIR-MOHAND KACI Hakima

Professeur à Univ.Boumerdes

Examinatrice

M^{me} MOHAMED MAHMOUD Fadhila

MCA à Univ.Blida 1

Examinatrice

Année Universitaire 2024-2025

Recherche sur le potentiel insecticide des entomopathogènes associés aux citrus

Résumé

La lutte biologique est une stratégie importante comme une alternative aux pesticides chimiques en raison de leur faible pollution environnementale et de leur Inoffensivité pour la santé humaine. l'application directe d'agents de contrôle biologique, ont fourni des solutions contre une variété de ravageurs et de maladies. Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur l'isolement, l'identification et la caractérisation des champignons entomopathogènes isolés à partir des cadavres d'insectes et des bactéries entomopathogènes isolées du sol d'agrumes cultivés, et l'évaluation de leur potentiel insecticide contre le puceron farineux du prunier, *Hyalopterus pruni* (Geoffroy 1762) et le puceron noir de la fève *Aphis fabae* (Scopoli 1763), (Hemiptera : Aphididae).

Au total, sept isolats bactériens et trois isolats fongiques ont généré un potentiel insecticide significatif à différentes doses, et l'identification moléculaire basée sur le séquençage de leurs génomes d'ARNr 16S et de ITS et EF respectivement pour les bactéries et champignons, a révélé que les isolats étaient identifiés comme suit pour les bactéries : *Lysinibacillus fusiformis* (B4), *Bacillus thuringiensis* (B13), *Bacillus thuringiensis* (B22), *Bacillus thuringiensis* (B23), *Bacillus thuringiensis* (B24), *Pseudomonas* sp. (P2), *Enterococcus gallinarum* (P4), et *Penicillium* sp. (A ITS), *Aspergillus terreus* (B ITS) et *Lecanicillium lecanii* (C ITS) pour les champignons. Le taux de mortalité le plus élevé des souches bactériennes était celui de P4 (*Enterococcus gallinarum*), qui a montré une mortalité totale (100 %) après 72 heures de traitement à la concentration C3 : 1×10^6 UFC/ml, où cette souche a présenté la CL_{50} la plus faible de 1.08×10^2 UFC/ml comme le meilleur potentiel insecticide en parallèle P2 (*Pseudomonas* sp.) a présenté le plus court TL_{50} de 1.4 jours à la concentration C4 : 1×10^5 UFC/ml *in vitro* contre *H. pruni*. Par rapport aux essais biologiques contre *A.fabae* les souches P4 et B22 ont engendré le meilleur taux de mortalité 85.71% aux concentration C1 (1×10^8 UFC/ml) et C3 (1×10^6 UFC/ml) respectivement et la souche B24 a manifesté le meilleur potentiel insecticide par la plus faible CL_{50} (7.92×10^5 UFC/ml) et par le plus court temps léthal TL_{50} (1.15 jours). Les résultats des souches fongiques ont révélé que la souche A ITS (*Penicillium* sp.) a eu un effet insecticide important *A.fabae*, avec un taux de mortalité de 62.33 % après 10 jours d'application à la concentration 3.6×10^7 spore/ml et avec une valeur de CL_{50} 9.26×10^9 spore/ml et TL_{50} de 7.77 jours *In vivo*. La détermination de la CL_{50} pour évaluer et comparer leurs potentiels insecticides, a révélé que la souche C ITS avait la CL_{50} la plus faible de 1.46×10^6 spore/ml et le plus court TL_{50} de 7.17 jours *In vitro* contre *H. pruni*.

Les résultats de cette étude ont validé la disponibilité, la richesse et la diversité des bactéries et champignons entomopathogènes associés aux citrus et l'exploitation future de ces genres dans la lutte à grande échelle contre les pucerons grâce à leurs enzymes et toxines, même contre les insectes nuisibles d'ordre général.

Mots clés : Entomopathogènes, Toxicité, Lutte biologique, Insectes ravageurs, Citrus.

Research into the insecticidal potential of entomopathogenics associated with citrus

Abstract

Biological control is an important strategy as an alternative to chemical pesticides due to their low environmental pollution and harmlessness to human health. direct application of biological control agents, have provided solutions against a variety of pests and diseases. In this study, we focused on the isolation, identification and characterization of entomopathogenic fungi isolated from insect cadavers and entomopathogenic bacteria isolated from cultivated citrus soil, and the evaluation of their insecticidal potential against the mealy plum aphid, *Hyalopterus pruni* (Geoffroy 1762) (Hemiptera: Aphididae), and the black bean aphid, *Aphis fabae* (Scopoli 1763).

A total of seven bacterial and three fungal isolates generated significant insecticidal potential at different doses, and molecular identification based on sequencing of their 16S rRNA genomes and ITS and EF respectively for bacteria and fungia revealed that isolates were identified as follows for bacteria: *Lysinibacillus fusiformis* (B4), *Bacillus thuringiensis* (B13), *Bacillus thuringiensis* (B22), *Bacillus thuringiensis* (B23), *Bacillus thuringiensis* (B24), *Pseudomonas* sp. (P2), *Enterococcus gallinarum* (P4), and *Penicillium* sp. (A ITS), *Aspergillus terreus* (B ITS) and *Lecanicillium lecanii* (C ITS) for fungi. The highest mortality rate of the bacterial strains was P4 (*Enterococcus gallinarum*), which showed total mortality (100%) after 72 hours of treatment at concentration C3: 1×10^6 CFU/ml, where this strain presented the lowest LC₅₀ of 1.08×10^2 CFU/ml as the best insecticidal potential in parallel P2 (*Pseudomonas* sp.) presented the shortest LT₅₀ of 1.4 days at concentration C4: 1×10^5 CFU/ml in vitro against *H. pruni*. In bioassays against *A.fabae*, strains P4 and B22 gave the best mortality rate of 85.71% at concentrations C1 (1×10^8 CFU/ml) and C3 (1×10^6 CFU/ml) respectively, while strain B24 showed the best insecticidal potential with the lowest LC₅₀ (7.92×10^5 CFU/ml) and the shortest lethal time LT₅₀ (1.15 days). Results from fungal strains revealed that strain A ITS had a significant insecticidal effect on the black bean aphid (*Aphis fabae*), with a mortality rate of 62.33% after 10 days at the concentration 3.6×10^7 spore/ml with an LC₅₀ value of 9.26×10^9 spore/ml and LT₅₀ of 7.77 days *In vivo*. Determination of the LC₅₀ to evaluate and compare their insecticidal potential revealed that the C ITS strain had the lowest LC₅₀ of 1.46×10^6 spore/ml and the shortest LT₅₀ of 7.17 days *In vitro* against *H. pruni*.

The results of this study validated the availability, richness and diversity of entomopathogenic bacteria and fungi associated with citrus and the future exploitation of these genera in large-scale aphid control through their enzymes and toxins, even against general insect pests.

Keywords: Entomopathogenic, Toxicity, Biological control, Insects pest, Citrus.

البحث في إمكانات المبيدات الحشرية لمسببات الأمراض الحشرية المرتبطة بالحمضيات

ملخص

تُعد مكافحة البيولوجية استراتيجية مهمة كبديل للمبيدات الكيميائية بسبب قلة تلوثها البيئي وعدم ضررها على صحة الإنسان. وقد وفر التطبيق المباشر لكائنات مكافحة البيولوجية حلاً ضد مجموعة متنوعة من الآفات والأمراض. ركزنا في هذه الدراسة على عزل وتحديد وتوصيف الفطريات الممرضة للحشرات المعزولة من جثث الحشرات والبكتيريا الممرضة للحشرات المعزولة من تربة الحمضيات المزروعة، وتقييم قدرتها على مكافحة حشرة المن الدقيقي، (*Hyalopterus pruni* (Geoffroy 1762) (Hemiptera: Aphididae)، وحشرة المن الأسود (Scopoli 1763)

Aphis fabae

أنتج مجموعة سبع عزلات بكتيرية وثلاث عزلات فطرية قدرة كبيرة على إبادة الحشرات بجرعات مختلفة، وكشف التحديد الجزيئي بناءً على تسلسل جينومات 16S rRNA و ITS و EF على التوالي للبكتيريا والفطريات أن العزلات تم تحديدها على النحو التالي بالنسبة للبكتيريا: *Bacillus thuringiensis* (B13)، *Lysinibacillus fusiformis* (B4)، *Bacillus thuringiensis* (B22)، *Bacillus thuringiensis* (B23)، *Bacillus thuringiensis* (B24)، *Pseudomonas* sp. (P2)، *Enterococcus gallinarum* (P4)، و *Penicillium* sp. (A ITS)، *Aspergillus terreus* (B ITS) et *Lecanicillium lecanii* (C ITS) وكانت أعلى قدرة على الإبادة الحشرية لهذه السلالات هي قدرة سلالة (P4) من سلالة *Enterococcus gallinarum* (P4)، والتي أظهرت نفوقاً تاماً (100%) بعد 72 ساعة من المعالجة عند التركيز ($C3 = 1 \times 10^6$ وحدة كروموفور/مل) حيث قدمت هذه السلالة أقل تركيز مميت لنصف العينة (CL_{50}) قدره 1.08×10^{-2} وحدة من الوحدة المجهرية الكافية/مل ($C4 = 1 \times 10^5$ وحدة مجهرية/مل) كأفضل مبيد حشري محتمل. بالتوازي مع ذلك أظهرت السلالة (P2) (*Pseudomonas* sp.) أقصر زمن مميت TL_{50} قدره 1.4 يوم عند التركيز $C4: 1 \times 10^5$ وحدة مغذية/مل في المختبر ضد *H. pruni*. وفي الاختبارات البيولوجية ضد *A. fabae*، أنتجت السلالتان P4 و B22 أفضل معدل نفوق بنسبة 85.71% عند التركيز $C1 (1 \times 10^8$ وحدة من الفئة الكرية المجهرية/مل) و $C3 (1 \times 10^6$ وحدة من الفئة الكرية المجهرية/مل) على التوالي، وأظهرت السلالة B24 أفضل قدرة على إبادة الحشرات بأقل تركيز مميت لنصف العينة (CL_{50}) ($10^5 \times 7.92$) وحدة من الفئة الكرية المجهرية/مل) وأقصر زمن مميت TL_{50} (1.15 يوم). وكشفت نتائج السلالات الفطرية أن السلالة *Penicillium* sp. (A ITS) كان لها تأثير مبيد حشري كبير على حشرة من الفاصوليا السوداء (*Aphis fabae*) بمعدل نفوق بلغ 62.33% بعد 10 أيام عند التركيز (3.6×10^7 جراثيم/مل) مع قيمة تركيز مميت CL_{50} قدرها 9.26×10^9 جراثيم/مل و TL_{50} قدره 1.4 يوم في الجسم الحي. كشف تحديد التركيز المميت CL_{50} لتقييم ومقارنة قدرتها على الإبادة الحشرية عن أن سلالة C ITS لديها أقل تركيز المميت CL_{50} يبلغ 1.46×10^6 جراثيم/مل و أقصر زمن مميت TL_{50} قدره 1.4 يوم في المختبر ضد *H. pruni*. وأثبتت نتائج هذه الدراسة توافر و ثراء وتنوع البكتيريا والفطريات الممرضة للحشرات والفطريات المرتبطة بالحمضيات والاستغلال المستقبلي لهذه الأجناس في مكافحة حشرات المن على نطاق واسع باستخدام إنزيماتها وسمومها حتى ضد الآفات الحشرية العامة.

الكلمات المفتاحية: مسببات الأمراض الحشرية، السمية، مكافحة البيولوجية، الآفات الحشرية، الحمضيات.

Remerciements

Tout d'abord, je remercie **Dieu** qui m'a réuni dans le chemin de la science et qui nous a apporté la foi, la force et le courage pour accomplir ce travail.

*Nos remerciements les plus sincères s'adressent à ma directrice de la thèse **Mme ALLAL BEN FEKIH L., PROFESSEUR** à l'université Saad Dahleb Blida 1 qui a bien voulu, par son aimable bienveillance, diriger cette étude, qui a fait preuve d'une grande patience. Ses conseils, ses orientations, sa compétence, sa gentillesse et ses intérêts portés pour ce sujet de recherche m'a permis de mener à terme ce travail.*

*J'exprime mes respectueux dévouements et ma gratitude aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail : **M^{me} MOUMENE-MESSGO S** Professeur à l'Université de Blida qui m'a fait l'honneur de présider ce jury **M^{me} OULEBSIR-MOHAND KACI H** Professeur à l'Université de Boumerdes et **M^{me} MOHAMED MAHMOUD F** Maître de Conférences A à l'Université de Blida 1 qui ont accepté de faire partie de ce jury en tant qu'examinateurs de ce modeste travail*

*J'adresse mes remerciements à **M^{me} MOUMEN-MESGUO Saïda** Professeur à l'Université de Blida 1 et membre de recherche au niveau du laboratoire de recherche LRPMA, pour leur précieux conseils et orientations durant mon travail au niveau du Laboratoire*

*J'adresse mes remerciements à **M^{me} BENZINA Farida** maître conférence à l'université de m'hamed bougara de Boumerdes pour son aide et sa disponibilité pour compléter une partie de ce travail de recherche.*

Que tous ceux et celles qui m'ont aidée et que je n'ai pas cité, sachent que ma reconnaissance est profonde et que mon respect leur est profondément acquis.

je me permets d'adresser aussi mes remerciements à ma famille, qui ont contribués Beaucoup d'une manière ou d'une autre, durant toute la période de ce travail.

À tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à réaliser ce travail, auxquels

Nous disons tout simplement merci.

HAFSA Mohamed

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail.

Aux deux personnes les plus chères, **mes parents**, pour leur amour, leurs encouragements, leur patience et leurs aides continuelles le long de mon parcours d'études.

A mes frères Abd-el Aziz, Salim et Rabah

A ma sœur Hafida et son mari Hocine

A mes neveux : Abir, Sid Ahmed, Abdelfattah et Roaya.

A mes belles sœurs Nawal, Soumia et Abir, et leurs enfants : Ahmed, Inès, Abdelmoumen, Abderrazak, Lilia, Wassim, Mohamed, Chakib et Mélina.

A toute la famille : Hafsa

A toute la famille : Rabah

A mes amis : Younes, Amine IF, Moncef, Bilal, Nasser Eddine.

A mes collègues au cours de la formation doctoral : Nesrine, Amine, Amira, Hind, Safia, Rym, Fatima el Zohra, Imane, Naima, Amel et Mustapha

A tous l'équipe du laboratoire de recherche LRPMA, Doctorants et Enseignants

A Docteur Randa BENABDALLAH pour son aide et encouragement à la finalisation de la thèse

Enfin, je souhaite adresser mes chaleureux remerciements à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

HAFSA Mohamed

Recherche sur le potentiel insecticide des entomopathogènes associes aux citrus

Table des matières

Résumé	
Abstract	
الملخص	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
INTRODUCTION GENERALE	01
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
Partie I : Généralités sur les insectes ravageurs	
I.1 Aperçu général	06
I.2 Le puceron noir de la fève « <i>Aphis fabae</i> » et Le puceron farineux du prunier « <i>Hyalopterus pruni</i> »	06
I.2.1 Généralités.....	06
I.2.2 Classification.....	06
I.2.3 Description.....	07
I.2.4 Cycle biologique.....	07
I.2.5 Dégâts	09
I.2.6 Méthodes de lutte	10
Partie II : La lutte biologique	
II.1 Introduction.....	11
II.2 Les champignons entomopathogènes.....	11
I.2.1 Données générales	11
I.2.2 Position systématique	12
I.2.3 Mode d'action	12
I.2.4 Facteurs de virulence	14
II.3 Les Bactérie entomopathogènes.....	15

I.3.1 Données générales	15
I.3.2 Position systématique	15
I.3.3 Mode d'action	17
I.3.4 Facteurs de virulence	17
II.4 Exemples d'utilisation des entomopathogènes en lutte biologique	19
II.4.1 Utilisation les champignons entomopathogènes en lutte biologique.....	19
II.4.1.1 Exemple d'utilisation	19
II.4.2 Utilisation les bactéries entomopathogènes en lutte biologique.....	20
II.4.2.1 Exemple d'utilisation	20
Partie III : Généralités sur les citrus	
III.1 Donnés générales	22
III.2 Les agrumes dans le monde	22
III.3 Les agrumes en Algérie	23
III.4 Caractéristiques géographiques de la région d'étude	23
III.5 Biodiversité microbienne des vergers d'agrumes.....	24
Chapitre II : Matériel et méthode	
II.1. Matériel biologique et non biologique	25
II.2. Méthodologie d'étude	26
II.2.1. Isolement, identification et toxicité des souches fongiques testées	26
II.2.1.1. Récolte des cadavres d'insectes	26
II.2.1.2. Isolement	26
II.2.1.3. Purification et identification des isolats fongiques	27
II.2.1.4. Etude de l'effet des isolats fongiques contre les deux espèces d'aphides.	29
II.2.1.4.1. Préparation des solutions fongiques	29
II.2.1.4.2. Concentrations utilisées	30
II.2.1.4.3. Tests d'entomopathogénicité contre le puceron farineux <i>H. pruni</i> .	30
II.2.1.4.4. Tests d'entomopathogénicité contre le puceron noir de la fève <i>Aphis fabae</i>	32

II.2.1.5. Confirmation des souches fongiques testées à partir des cadavres de pucerons expérimentés	35
II.2.2. Isolement, identification et toxicité des souches bactériennes testées, à partir du sol. 37	
II.2.2.1. Echantillonnage du sol	37
II.2.2.2. Préparation des dilutions	37
II.2.2.3. Isolement et purification des souches bactériennes	38
II.2.2.4. Identification des isolats bactériens	39
II.2.2.5 Etude de l'effet des isolats bactériens contre les deux espèces d'aphides...	45
II.2.2.5.1 Préparation des solutions bactériens	45
II.2.2.5.2 Tests d'entomopathogénicité contre le puceron farineux <i>H. pruni</i> ..	47
II.2.2.5.3 Tests d'entomopathogénicité contre le puceron noir de la fève <i>Aphis fabae</i>	48
II.2.3. Analyse statistique des résultats de mortalités	49

Chapitre III Résultats

III.1 Identification, caractérisation et potentiel insecticide des souches fongiques étudiées. 50	
III.1.1 Identification macroscopique et microscopique	50
III.1.2 Caractérisation moléculaire	50
III.1.3 Evaluation du potentiel insecticide des isolats fongiques étudiés	52
III.1.3.1 Symptômes observés sur les pucerons infestés	52
III.1.3.2 Effet entomopathogène sur <i>H. pruni</i>	53
III.1.3.2.1 Toxicité par trempage des feuilles d'abricotier <i>in vitro</i>	53
III.1.3.2.2. Toxicité par contact sur le feuillage d'abricotier sur terrain. 56	
III.1.3.3. Effet entomopathogène sur <i>A. fabae</i>	56
III.1.3.3.1. Toxicité par trempage des feuilles de fève <i>in vitro</i> ... 56	
III.1.3.3.2. Toxicité par contact sur les plants de fève <i>in situ</i> 57	
III.1.4. Confirmation des souches fongiques étudiées après les bioessais ...	59
III.2. Isolement, caractérisation et potentiel insecticide des isolats bactériens étudiés... 60	
III.2.1. Identification macroscopique et microscopique	60
III.2.2. Résultats des tests d'orientation	60

III.2.3. Caractérisation moléculaire	61
III.2.4. Evaluation du potentiel insecticide des isolats bactériens étudiés	64
III.2.4.1. Symptômes observés sur les pucerons infestés	64
III.2.4.2. Effet entomopathogène sur <i>H. pruni</i>	64
III.2.4.2.1. Sélection globale des isolats efficaces après 72heures	64
III.2.4.2.2. Toxicité des isolats les plus efficaces sélectionnés, à 24h, 48h et 72h	65
III.2.4.2.3. Détermination des concentrations (CL ₅₀ et CL ₉₀) et des temps létaux (TL ₅₀ et TL ₉₀)	67
III.2.4.3. Effet entomopathogène sur <i>A. fabae</i>	68
III.2.4.3.1. Toxicité temporel global.....	68
III.2.4.3.2. Effet isolat à 72h	69
III.2.4.3.3. Détermination des concentrations (CL ₅₀ et CL ₉₀) et des temps létaux (TL ₅₀ et TL ₉₀)	70

Chapitre IV : Discussion

IV. Discussion	72
IV.1. Potentiel entomopathogène des isolats fongiques testés	72
IV.2. Potentiel entomopathogène des isolats bactériens testés	75
IV.3. Comparaison d'effet insecticide entre les bactéries et champignons entomopathogènes.....	83
Conclusion	84
Références bibliographiques	86
Annex	108

Listes des Figures

Figure	Titre	Page
01	Puceron noir de la fève <i>Aphis fabae</i> [46].	07
02	Puceron farineux du prunier (Individu aptère) (a) [44], Puceron farineux du prunier (Individu ailé) (b) [50],	07
03	Cycle de vie d' <i>Aphis fabae</i> [52].	08
04	Cycle biologique du puceron farineux, <i>Hyalopterus pruni</i> [53].	08
05	Dégâts du puceron noir <i>Aphis fabae</i> sur fève [59].	09
06	Dégâts de <i>H. pruni</i> sur les feuilles de pêcher et prunier [62].	09
07	Mode d'action des champignons entomopathogènes [86].	13
08	La classification bactérienne [106].	16
09	Mode d'action des <i>Bacillus thuringiensis</i> sur les cellules intestinales des insectes [111].	17
10	Les Principaux pays producteurs d'agrumes dans le monde [150].	22
11	Localisation géographique de la plaine de la Mitidja [154].	23
12	Cadavre d'un aleurode (Insecte, Homoptera) infesté par des champignons	25
13	Adulte aptère du puceron noir de la fève <i>Aphis fabae</i> (a), Colonies du puceron farineux <i>Hyalopterus pruni</i> sur une feuille d'abricotier (b)	25
14	Plants de fève cultivés en pots sous serre	26
15	Développement du mycélium.	27
16	Préparation des suspensions fongiques.	29
17	Les arbres d'abricotiers infestés par le puceron farineux à la station expérimentale de l'Université Blida 1.	30
18	Désinfection des feuilles saines d'abricotier	31
19	Immersion des feuilles d'abricotier dans les solutions fongiques (a) ; (b), et infestation les feuilles par les pucerons <i>H. pruni</i> (c) ; (d).	31
20	Application des solutions fongiques sur les feuilles infestées par le puceron <i>H. pruni</i> .	32
21	Plantes de fèves infestées par <i>Aphis fabae</i> à Meftah (a) et à la station expérimentale de l'USDB-1) (b).	32
22	Désinfection les feuilles et tiges de fève.	33
23	Immersion des feuilles et des tiges de fève dans les solutions fongiques (a) ; (b). Disposition des feuilles de fève disposants de pucerons <i>A. fabae</i> dans les boîtes de Pétri avec du Coton (c) ; (d).	33
24	Immersion des feuilles et des tiges de fève dans les solutions fongiques (a) ; (b). Disposition des feuilles de fève disposants de pucerons <i>A. fabae</i> dans les boîtes de Pétri avec du Coton (c) ; (d).	34

25	Méthode d'infestation des plants de la fève par les pucerons.	34
26	Expérimentation de pulvérisation sur plantes de fève avec différentes solutions et couverture de protection.	35
27	Etapes de confirmation de la pathogénicité de souches fongiques testées sur les pucerons : mise en conditions humides des cadavres d'insectes (a), développement du mycélium fongique des souches utilisées sur les cadavres d'insectes incubés (b, c,d).	36
28	Parcelles de prélèvement des échantillons.	37
29	Préparation des solutions mères de sol.	37
30	Préparation des dilutions.	38
31	Etalement les dilutions du sol.	38
32	Colonies suspectes de <i>Bacillus</i> (a), et de <i>Pseudomonas</i> (b).	39
33	Coloration au bleu de méthylène	39
34	Préparation du frottis	40
35	Coloration de GRAM.	40
36	Test de catalase.	41
37	Test de d'oxydase.	41
38	Milieu TSI	41
39	Prélèvement d'une colonie bactérienne pure et jeune	42
40	Ensemencement en surface avec une piqûre centrale.	42
41	Milieu Citrate de Simmons.	43
42	Ensemencement sur le milieu citrate de Simmons.	43
43	Milieu Mannitol-Mobilité.	43
44	Ensemencement par piqûre centrale.	43
45	Prélèvement d'une culture jeune de 18hà24h (a), Préparation des suspensions bactériennes (b), agitation par vortex (c).	46
46	Spectrophotomètre (a), La fixation de la turbidité (b).	46
47	Préparations les jeunes pousse sains.	47
48	Application les essais biologiques sur le puceron farineux du prunier <i>in vitro</i> .	48
49	Application les essais biologiques sur le puceron noir de la fève <i>in vivo</i> .	49
50	Arbre phylogénétique des souches fongiques utilisant la méthode de neighbor-joining basée sur le séquençage des gènes ITS et EF 1.	52
51	Symptômes de morbidité des pucerons <i>Aphis fabae</i> (a) et <i>Hyalopterus pruni</i> (b) sous l'effet des souches fongiques étudiées (G × 2).	52

52	Variation temporelle des mortalités moyennes de <i>H. pruni</i> sous l'effet de la concentration de 2.2×10^7 spores / ml dans la modalité de traitement par trempage	54
53	Mortalités corrigées temporelles de <i>A. fabae</i> à la concentration de 3.6×10^7 spores/ml dans les conditions naturelles.	57
54	Développement du mycélium fongique (Souche A - a, souche B - b; Souche C- c) sur milieu PDA, à partir des pucerons infestés morts.	60
55	Caractères macroscopique et microscopique des genres <i>Bacillus</i> et <i>Pseudomonas</i> .	60
56	Arbre phylogénétique des souches bactériennes testées utilisant la méthode de neighbor-joining basée sur l'analyse des séquences de leur gène ARNr 16S.	63
57	Effet des souches bactériennes étudiées sur <i>Aphis fabae</i> (a) et <i>Hyalopterus pruni</i> (b).	64
58	Effet de tous les isolats bactériens contre <i>Hyalopterus pruni</i> , à 72 heures après l'application du traitement à une concentration de 1×10^8 UFC/ml.	65
59	Effet des isolats bactériens sélectionnés aux différentes concentrations testées contre <i>H. pruni</i> 72 heures après application des traitements.	66
60	Effet des isolats bactériens sélectionnés aux différentes concentrations 72 heures après application contre <i>Aphis fabae</i> .	79

Liste des Tableaux

Tableau	Titre	Page
01	Aspects macroscopique et microscopique (G × 40) des isolats fongiques étudiés.	50
02	Proposition d'identification des isolats fongiques étudiés, sur la base de l'analyse BLAST de séquences des gènes ITS et EF.	51
03	'Accession number' des souches fongiques identifiées dans la base de données GenBank.	51
04	Variation des concentrations des souches fongiques étudiées utilisées contre <i>H. pruni</i> .	54
05	Concentrations létales (CL ₅₀ et CL ₉₀ en spore/ml) des trois souches fongiques étudiées sur <i>H. pruni</i> dans la modalité de traitement indirect par trempage.	55
06	Valeurs des temps létaux TL ₅₀ et TL ₉₀ (Jours) des trois souches fongiques testées sur <i>H. pruni</i> dans la modalité de traitement indirect par trempage.	55
07	Mortalités de <i>A. fabae</i> (moyennes estimées ± Ecart type) sous l'effet des trois souches fongiques selon la modalité de traitement par trempage.	56
08	Valeurs des temps létaux TL ₅₀ et TL ₉₀ (Jours) de <i>A. fabae</i> sous l'effet-de la souche fongique A en conditions naturelles.	59
09	Proposition d'identification des isolats bactériens, sur la base de l'analyse BLAST de leurs séquences du gène de l'ARNr 16S.	61
10	'Accession number' des isolats bactériens testés (base de données GenBank)	62
11	Mortalité moyenne (%) des pucerons <i>H. pruni</i> sous l'effet des isolats sélectionnés après 24, 48 et 72 heures	65
12	Valeurs de concentrations létales CL ₅₀ et CL ₉₀ (UFC/ml) pour les souches B22, B23, P2, P4 en comparaison aux souches de référence <i>Bt</i> (HF911367) <i>Pf</i> (HF911366).	67
13	Valeurs des temps létaux TL ₅₀ et TL ₉₀ (Heures) pour les souches B22, B23, P2, P4 en comparaison aux souches de référence <i>Bt</i> (HF911367) et <i>Pf</i> (HF911366).	68
14	Mortalités moyennes (%) des pucerons <i>A. fabae</i> sous l'effet des isolats bactériens sélectionnés 24, 48 et 72 heures après traitement.	69

15	Valeurs de concentrations létales CL ₅₀ et CL ₉₀ (UFC/ml) pour les souches B22, B23, B24, P4 en comparaison aux souches de référence BT (HF911367) PF (HF911366).	70
16	Valeurs des temps létaux TL ₅₀ et TL ₉₀ (Jours) pour les souches B22, B23, B24, P4 en comparaison aux souches de référence Bt (HF911367) Pf (HF911366).	71
I	ANOVA de l'effet des trois souches fongiques <i>in vitro</i> à différentes concentrations contre <i>H. pruni</i>	108
II	Résultats de l'ANOVA de la comparaison des moyennes de mortalité de <i>A.fabae</i> sous l'effet des trois souches fongiques <i>in vitro</i> à la concentration de 2.4×10^7 spores / ml	108
III	ANOVA de l'effet de la souche A <i>in vivo</i> à différentes concentrations contre <i>A. fabae</i> .	108
IV	Equations de la droite de régression linéaire pour l'estimation des Temps Létaux des trois souches fongiques contre <i>H.pruni in vitro</i>	109
V	Equations de la droite de régression linéaire pour l'estimation des Temps Létaux de la souche fongiques A contre <i>A.fabae in vivo</i>	109
VI	Equations de la droite de régression linéaire pour l'estimation des Concertations létales des trois souches fongiques contre <i>H.pruni in vitro</i>	109
VII	Equations de la droite de régression linéaire pour l'estimation des Concertations létales de la souche fongiques A contre <i>A.fabae in vivo</i>	109
VIII	Equations de la droite de régression linéaire pour l'estimation des Temps Létaux des souches bactériennes contre <i>H.pruni in vitro</i>	109
IX	Equations de la droite de régression linéaire pour l'estimation des Temps Létaux des souches bactériennes contre <i>A.fabae in vitro</i>	110
X	Equations de la droite de régression linéaire pour l'estimation des Concertations létales des souches bactériennes contre <i>H.pruni in vitro</i>	110
XI	Equations de la droite de régression linéaire pour l'estimation des Concertations létales des souches bactériennes contre <i>A.fabae in vitro</i>	111

Liste des Abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ANOVA	Analyse de la variance
ARN	Acide Ribonucléique.
ARNr 16S	Molécules d'ARN ribosomal de la petite sous-unité
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BN	Bouillon Nutritive
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
C	Concentration
CL	Concentration létal
dl	Degré de liberté
EF-1 α	Elongation Factor 1-alpha
FAO	Food and Agriculture Organization
<i>H. pruni</i>	<i>Hyalopterus pruni</i>
H ₂ S	Sulfure d'hydrogène
ITS	Internal Transcribed Spacers
LSD	least significant difference
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>Pf</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
PGPR	Plant Growth Promotion <i>Rhizobacteria</i>
Rpm	Route Par Minute
TL	Temps létale
UFC	Unité formant colonies

Introduction

Introduction générale

Les insectes nuisibles font partie des bioagresseurs qui représentent un risque important pour la production agricole, en ayant un impact sur le niveau de production, la qualité et la valeur du rendement des cultures [1]. Parmi les différents insectes ravageurs qui causent des dommages graves aux cultures agricoles, on peut citer les pucerons. Les pucerons sont des petits insectes suceurs de sève qui se nourrissent des plantes, affaiblissant ainsi leur croissance et leur développement et sont considérés comme de graves insectes nuisibles pour l'agriculture et l'horticulture. L'impact des pucerons en tant que ravageurs est bien défini par le taux de croissance de leur population, une métrique qui incorpore leur développement spécifique à l'âge, leur capacité de survie et leur fécondité [2,3]. Ces insectes opophages sont directement responsables de la destruction de nombreuses plantes cultivées importantes sur le plan économique, en suçant la sève, et sont responsables aussi des dommages indirects en tant que vecteurs de diverses maladies virales [4].

La majorité de ces organismes sont oligophages et monophages, seules quelques espèces sont polyphages, tel le puceron *Hyalopterus pruni*, qui est le principal ravageur de plusieurs cultures du genre *Prunus*, à savoir le pêcher (*Prunus persica*), l'amandier (*Prunus dulcis*), l'abricotier (*Prunus armeniaca*), le prunier (*Prunus domestica*) et le prunellier (*Prunus spinosa*). Les cultures de prunus sont considérées comme les cultures les plus connues en termes d'impact économique et de production. dans le monde entier [5], sous les climats tempérés et méditerranéens notamment, plus qu'en Europe et en Amérique du Nord. Le puceron farineux du prunier, *Hyalopterus pruni* (Geoffroy 1762) (Hemiptera : Aphididae) [6], cause des dommages directs aux arbres. D'une part, son impact négatif sur le rendement des fruits entraîne une dégradation de leur qualité, une diminution de leur calibre et leur déformation, ou leur chute avant leur maturation [7]. D'autre part, l'infestation par ce puceron affaiblit l'arbre en absorbant la sève du phloème, ce qui modifie la forme des organes (comme l'enroulement des feuilles et la torsion des tiges), provoquant la chlorose, le développement de moisissures fuligineuses sur le miellat et la chute des feuilles. Ces conséquences peuvent conduire à une baisse des réserves, affectant la croissance à long terme [8,9]. *Hyalopterus pruni* est le principal vecteur de transmission du plum pox virus (PPV) [10,11]. Ce virus est responsable de la maladie du requin, qui menace le rendement en fruits des arbres du genre *Prunus*, causant des pertes économiques importantes [12].

Une seconde espèce de puceron est considérée comme des plus dangereux ravageurs polyphages, est le puceron noir de la fève *Aphis fabae* (Scopoli 1763) (Hemiptera :

Aphididae) [13]. C'est un ravageur commun des fèves, des haricots, du manguier, de la betterave sucrière, de la betterave fourragère et de l'épinard. Les pucerons noirs infestent d'autres plantes cultivées et adventices, notamment la rhubarbe, le dahlia, la capucine, le rumex et le chardon. Les dommages sont principalement causés par la perte de sève de la plante et par les lésions des tissus végétaux pendant l'alimentation. La présence de nombreux groupes de pucerons en peu de temps réduit la vigueur des plantes. La fève est considérée comme l'une des principales cultures, et c'est la troisième légumineuse au monde, elle est récoltée entre le printemps jusqu'au début de l'été. En raison de sa grande richesse en nutriments précieux, elle constitue une source de protéines primaires dans le régime alimentaire de masse [14].

L'application mondiale d'insecticides synthétiques comme principal moyen de lutte contre les pucerons sur diverses cultures a entraîné divers problèmes, tels que l'échec de la lutte contre les ravageurs, des effets négatifs sur l'environnement et l'apparition d'une résistance des pucerons aux insecticides rendant malheureusement ces insecticides inutiles et entravant la gestion à long terme. En outre, les impacts nuisibles sur la santé humaine dus à l'utilisation indiscriminée des pesticides, à l'empoisonnement par inhalation, à la toxicité dans la chaîne alimentaire, à la contamination des eaux de surface et souterraines et à d'autres problèmes environnementaux constituent un obstacle sérieux à la capacité de sauvegarder la quantité et la qualité de nombreuses cultures importantes [15, 16]. Il est donc impératif de favoriser l'utilisation d'insecticides biologiques pour lutter contre les insectes nuisibles, ce qui encourage les producteurs agricoles à rechercher et à adopter des méthodes de lutte alternatives efficaces, telles que la lutte biologique à l'aide d'ennemis naturels des ravageurs [17].

La lutte biologique désigne l'emploi d'organismes et/ou de composés naturels en vue de l'élimination ou de la régulation d'autres organismes nuisibles, que ce soit dans un contexte agronomique ou dans des environnements naturels [18]. Ainsi, les biopesticides sont des éléments utilisés afin de contrôler les insectes nuisibles en utilisant des organismes vivants ou leurs dérivés. Les biopesticides peuvent être composés d'organismes tels que des plantes, des insectes, des micro-organismes comme des bactéries, des levures, des champignons, des virus, ou des nématodes, qui ont une action protectrice sur les plantes contre les agents phytopathogènes [19].

Parmi les agents de lutte biologique disponibles contre les insectes, les champignons entomopathogènes sont les pathogènes les plus importants. Comme il s'agit d'organismes

naturels, les champignons entomopathogènes sont considérés comme la solution la plus probable en remplacement des pesticides synthétiques (chimiques) et ils sont perçus comme étant plus inoffensifs à l'environnement que les pesticides chimiques. En outre, il est peu probable que les insectes ciblés développent une résistance contre eux, car leur mode d'action semble moins complexe que celui de leurs homologues [20]. Plus de 16 espèces de champignons sont connues pour infecter naturellement les pucerons. Les champignons entomopathogènes seraient efficaces contre tous les stades de développement (œufs, larves, stades intermédiaires et adultes) de divers insectes. Divers travaux sur les champignons entomopathogènes (recherche, production, stabilisation, formulation et application) ont largement contribué à la commercialisation de plus de 170 produits de biopesticides à base de champignons. Les produits les plus couramment utilisés sont ceux à base de *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, *Isaria fumosorosea* Wize, et *Beauveria brongniartii* [21]. Des études ont montré que l'efficacité d'un champignon entomopathogène dépend de sa capacité à produire de nombreuses spores. Celles-ci pénètrent directement la cuticule en la brisant et entrent dans l'hémocoel de l'insecte. La cuticule des insectes est composée principalement de chitine et de protéines entourées de couches de cire et de lipides ou d'acides gras. La pathogenèse fongique commence par la dégradation de la cuticule grâce à la sécrétion d'enzymes dégradantes, dont les chitinases, les protéases et les lipases qui dégradent les chitines, les protéines et les lipides de la cuticule des insectes. Il a été rapporté que l'augmentation de la concentration en spores et du temps d'exposition entraîne une augmentation de la mortalité des pucerons liée au traitement avec des champignons entomopathogènes [22].

Les bactéries entomopathogènes du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* ont fait l'objet d'une attention particulière et d'études approfondies en tant qu'agents de contrôle biologique potentiels capables de lutter efficacement contre une grande variété d'insectes nuisibles d'importance commerciale. Les bactéries du genre *Bacillus*, telles que *Bacillus thuringiensis*, représentent environ 95% de l'économie mondiale des biopesticides [23]. Ces bactéries sont d'une importance significative dans le domaine de la lutte biologique en raison de leur utilisation extensive en tant qu'agents de lutte microbienne. *Bacillus thuringiensis* pendant la phase de sporulation, synthèse des protéines insecticides (toxines Cry/Cyt), qui ont démontré leur efficacité contre un éventail de groupes d'insectes ravageurs [24,25]. Cependant, des techniques d'infestation microbienne plus récentes sont également capables de cibler les pucerons. Les *Pseudomonas* sont également connus pour leur effet entomopathogène contre

plusieurs ravageurs, notamment les pucerons (Hemiptera) et la mouche commune des fruits (Diptera). Généralement, l'effet insecticide de ce genre de bactérie est basé sur la production de chitinases. *P. fluorescens* a montré sa capacité de contrôle des parasites, les insectes ravageurs et les maladies des plantes en protégeant les racines et les graines des infections fongiques [26]. Aussi, il est bien connu pour son pouvoir de réduire la gravité de nombreuses maladies fongiques et est considéré comme une souche de PGPR (Plant Growth Promotion Rhizobacteria) par la production de divers métabolites secondaires, notamment les cyanures d'hydrogène, les sidérophores et les antibiotiques [27].

Les sols cultivés sont riches en matières organiques et contiennent une population microbienne importante. Leur fertilité peut être indirectement corrélée à la biomasse microbienne globale qui dépend elle-même de la disponibilité et de la qualité du carbone appelé carbone organique du sol (Soil Organic Carbon ou SOC). Ainsi, la région la plus biologiquement active du sol est censée être les 20-30 cm supérieurs du sol où l'abondance des communautés microbiennes du sol est présente en raison de la richesse en SOC [28,29,30].

Le bassin méditerranéen est considéré comme la seconde zone de diversification des agrumes et a constitué un tremplin pour l'expansion des espèces agrumicoles cultivées à travers le monde. Ainsi, les pays méditerranéens sont des sources riches en germoplasmes ayant un potentiel considérable pour le développement de variétés nouvelles. L'industrie des agrumes est l'une des composantes principales de l'agriculture méditerranéenne. Leader mondial pour les petits agrumes, elle en représente 60% de la totalité du commerce international, un marché en pleine expansion en Europe, aux USA et au Japon [31]. En Algérie le nombre d'arbres d'agrumes occupent le second rang après l'olivier, mais leur importance économique les classe nettement en tête de nos productions fruitières. La culture commerciale des agrumes dans notre pays est localisée dans les zones irrigables de la partie nord du pays, où elle trouve la température clémente qui assure sa réussite, car celle – ci influe fortement sur la physiologie des agrumes. La plantureuse Mitidja, berceau de l'agrumiculture, a conservé sa suprématie d'antan, puisqu'elle groupe encore près du tiers des plantations algériennes [32,33].

La présente étude se veut une meilleure connaissance de nouvelles souches de champignons et bactéries entomopathogènes disponibles aux citrus et une contribution à l'étude de leur potentiel insecticide comme agents de la lutte biologiques contre les aphides, importants ravageurs bioagresseurs des cultures. Nous nous sommes basés sur l'évaluation de

la pathogénicité de souches fongiques isolées de cadavres d'insectes et des souches bactériennes à partir du sol des citrus à l'égard de deux espèces aphidiennes ; le puceron de la fève *Aphis fabae* et le puceron farineux du prunier *Hyalopterus pruni*, qu'ils sont caractérisés par leur polyphagie.

Notre travail est personnalisé sous forme de quatre grands chapitres.

Le premier chapitre est consacré aux trois différentes parties : partie I, généralités sur les insectes ravageurs, qui touche les données générales sur les deux insectes cibles dans ce travail ; partie II, La lutte Biologique, qui englobe les données bibliographiques sur la lutte biologique par les champignons et bactéries entomopathogènes. Avec quelques exemples d'utilisation des champignons et bactéries entomopathogènes dans la lutte biologique ; partie III, Généralités sur les citrus, qui illustre des données générales sur les citrus, la biodiversité microbienne des verger et sol cultivés par les citrus, leurs localisations au monde et en Algérie et leurs importance économique.

Le deuxième chapitre présente l'ensemble du matériel et les différentes méthodes utilisées pour les deux parties expérimentales de ce travail, à savoir l'isolement, l'identification, la caractérisation et la toxicité des champignons et bactéries entomopathogènes contre les deux insectes cibles.

Le troisième chapitre présente les résultats de chaque partie expérimentale avec leurs statistiques et interprétations.

Le quatrième chapitre traite de la discussion des résultats présentés avec leurs comparaisons aux autres travaux qui renforcent et assurent les résultats trouvés dans la présente étude.

Notre contribution est clôturée par une conclusion générale et des perspectives.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Partie I : Généralités sur les insectes ravageurs

I.1. Aperçu général

Les insectes ravageurs sont un problème fréquent pour les agriculteurs et l'environnement, ils peuvent causer d'importants dommages aux cultures et réduire considérablement les rendements agricoles, Il est impératif d'appliquer les nouvelles procédures de gestion efficaces pour contrôler et limiter la propagation des insectes nuisibles dans les exploitations agricoles [34]. Les pucerons sont considérés comme les insectes ravageurs répandus sur plusieurs cultures à travers le monde [35], leur diversification est similaire à celle des Angiospermes [36]. Ces ravageurs attaquent principalement les végétaux à fleurs, mais également les plantes résineuses, certaines fougères et mousses [37]. Dans les agrosystèmes, les pucerons *Aphis fabae* et *Hyalopterus pruni* sont fréquemment soumis à des mesures de contrôle afin de réduire leurs dégâts aux cultures [38].

I.2. Le puceron noir de la fève « *Aphis fabae* » et le puceron farineux du prunier « *Hyalopterus pruni* »

I.2.1. Généralités

- Le puceron noir de la fève *Aphis fabae* (**Figure 05**), est une espèce très polyphage qui attaque une variété des plantes cultivées (la betterave, la fève et la gourgane). Ce puceron attaque les tiges, les branches, les feuilles, les fleurs, les bourgeons et les fruits de toutes les plantes cultivées et sauvages, que ce soit en plein champ ou sous abri [39, 40].
- Le puceron farineux du prunier *Hyalopterus pruni* est une espèce de puceron largement répandue dans les régions tempérées [41,42,43], et considéré comme un insecte ravageur polyphage où les plantes cultivées du prunier, pêcher, l'amandier et l'abricotier sont ses hôtes primaires [44, 45].

I.2.2. Classification

Le puceron de noir de la fève [13] et le puceron farineux du prunier [6] sont classés comme suit :

- | | |
|--|--|
| ▪ Règne : Animalia | ▪ Règne : Animalia |
| ▪ Embranchement : Arthropoda | ▪ Embranchement : Arthropoda |
| ▪ Classe : Insecta | ▪ Classe : Insecta |
| ▪ Super-ordre : Hemipteroidea | ▪ Ordre : Hemiptera |
| ▪ Ordre : Hemiptera | ▪ Sous-ordre : Sternorrhyncha |
| ▪ Sous-ordre : Sternorrhyncha | ▪ Famille : Aphididae |
| ▪ Famille : Aphididae | ▪ Genre : <i>Hyalopterus</i> |
| ▪ Genre : <i>Aphis</i> | ▪ Espèce : <i>Hyalopterus pruni</i> (Geoffroy, 1762). |
| ▪ Espèce : <i>Aphis fabae</i> (SCOPOLI, 1763) | |

I.2.3. Description

- Le puceron *A. fabae* est un insecte de petite taille mesurant entre 1,5 et 3 mm de long, caractérisé par un corps de couleur noire à brun foncé, généralement revêtu d'une substance cireuse, [3] **(Figure 01)**. Les nymphes présentent une morphologie similaire à celle des adultes, bien qu'elles soient de taille réduite et de couleur plus claire [47], les formes ailées apparaissent sous des conditions défavorables pour permettre la dispersion [48].



Figure 01 : Puceron noir de la fève *Aphis fabae* [46].

- Les pucerons *Hyalopterus pruni* sont de petits insectes au corps mou et oval. de taille petite à moyenne, de forme allongée, la longueur du corps des individus aptère adulte est respectivement de 1,5 à 2,6 mm. Ils sont généralement de couleur vert pâle **(Figure 08)**. Ces pucerons possèdent des filaments recouverts de cire qui leur donnent un aspect farineux ou poudreux, leur assurant une certaine protection contre les prédateurs et les conditions environnementales [49]. **(Figure 02)**.

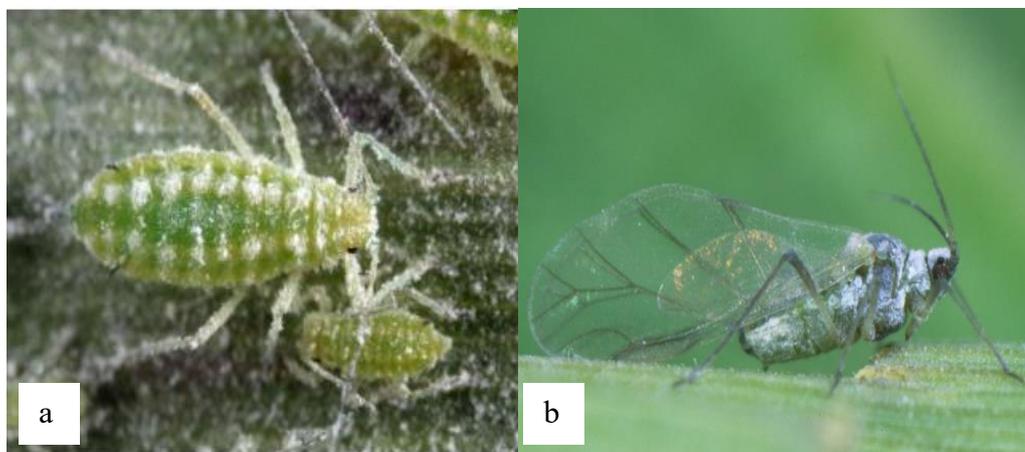


Figure 02 : Puceron farineux du prunier (Individu aptère) **(a)** [44], Puceron farineux du prunier (Individu ailé) **(b)** [50],

I.2.4. Cycle biologique

- Cette espèce est capable de générer plusieurs générations par an et de se développer sur plusieurs hôtes tout au long. La plante hôte hivernante est le fuseau (*Euonymus europaeus*). Les œufs éclosent au début du printemps et des colonies se forment sur les jeunes feuilles et les pousses. Les formes ailées apparaissent en mai et juin et, lorsque les

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

conditions météorologiques sont favorables, elles migrent vers une large gamme d'hôtes estivaux, elles ont été observées sur plus de 300 espèces de plantes. Dans des conditions chaudes, les colonies peuvent se développer rapidement et lorsqu'une surpopulation apparaît, des formes ailées sont produites pour élargir la distribution. (Figure 03) [51].

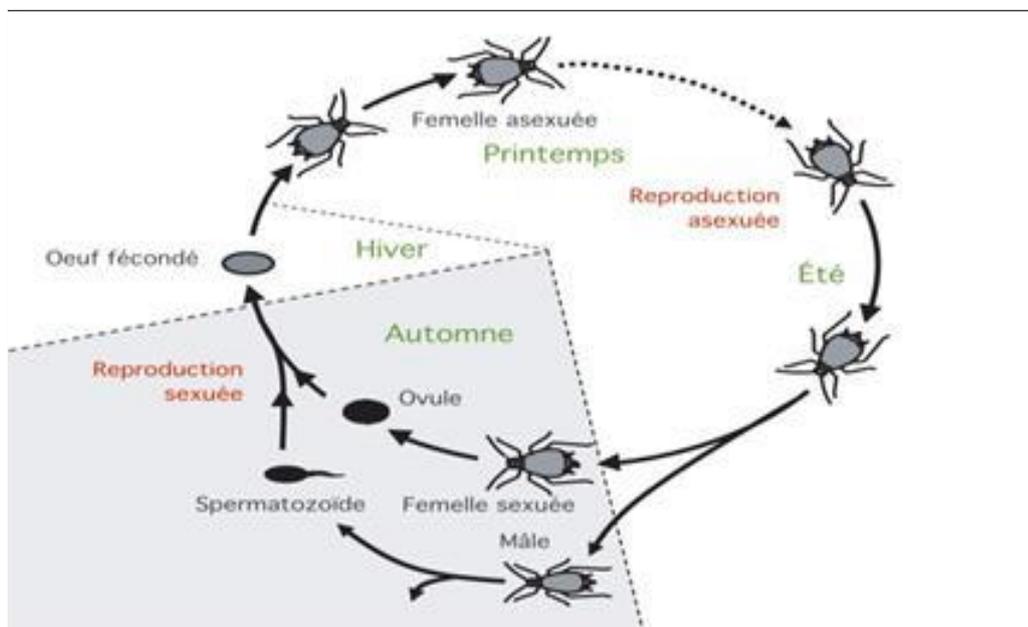


Figure 03 : Cycle de vie d'*Aphis fabae* [52].

- Les œufs du puceron farineux du prunier passent l'hiver près de la base des bourgeons des plantes ou dans l'écorce des troncs et des branches des arbres. Les œufs sont éclos au printemps et les adultes aptères se nourrissent des bourgeons et des feuilles qui s'ouvrent. En juin et juillet, les adultes ailés se développent et migrent vers des hôtes secondaires. Puis, à la fin de l'été et en automne, les adultes ailés retournent sur les hôtes primaires où ils s'accouplent et pondent les œufs pour l'hivernage [49]. (Figure 04)

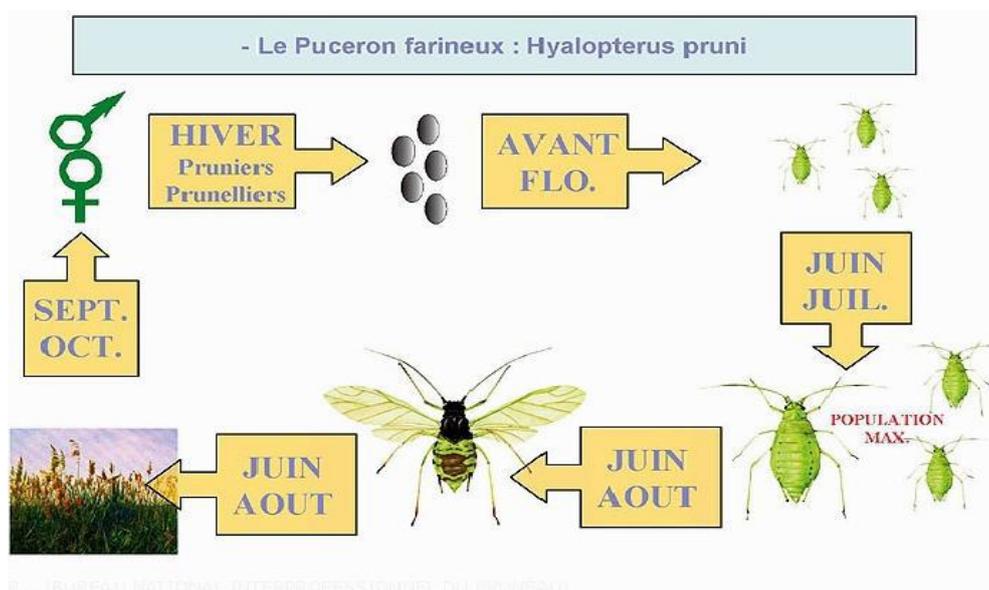


Figure 04 : Cycle biologique du puceron farineux, *Hyalopterus pruni* [53].

I.2.5. Dégâts

➤ Dégâts directs :

Les pucerons peuvent causer divers dommages aux arbres. En suçant la sève des feuilles et des jeunes pousses, ils privent les arbres de leurs nutriments essentiels [54]. De plus, l'alimentation des pucerons entraîne la déformation, le jaunissement et des feuilles, ce qui perturbe le processus de la photosynthèse et peut compromettre la production de fruits [55].

➤ Dégâts indirects :

Pour le puceron noir de la fève, notamment la production de miellat, qui contrarie l'activité photosynthétique et favorise le développement de champignons saprophytes causant des fumagines [56,57], (**Figure 05**), ainsi que la transmission de virus phytopathogènes en se déplaçant entre les plantes, comme le virus de la mosaïque jaune de la fève (*Bean Yellow Mosaic Virus*), transmis par *Aphis fabae* [58].



Figure 05 : Dégâts du puceron noir *Aphis fabae* sur fève [59].

Les pucerons peuvent également agir comme vecteurs de maladies virales, telles que la sharka du prunier [60], causant des dommages graves à l'arbre et réduisant sa production de fruits [61]. Tandis que les fruits produits par des arbres infestés par le virus, peuvent présenter une taille réduite (**Figure 06**), une forme médiocre et un goût altéré [44].



Figure 06 : Dégâts de *H. pruni* sur les feuilles de pêcher et prunier [62].

I.2.6 Méthodes de lutte

- **Lutte préventive** : Son principe repose sur les diverses pratiques culturelles en termes d'entretien de la culture :
 - L'élimination des mauvaises herbes présentes dans les champs est essentielle, car celles-ci peuvent constituer des vecteurs potentiels de virus transmissibles par les pucerons aux cultures saines environnantes [63].
 - La mise en place de plantes entre les rangées pour créer des barrières physiques [63].
 - Utiliser différentes cultures sur une même parcelle peut aider à contrôler naturellement les ravageurs en favorisant la présence d'autres insectes qui les attaquent comme les ennemis naturels [64].
- **Lutte chimique** : On combat ces nuisibles en ayant recours à des insecticides contenant des carbamates, des pyréthrinoïdes ou encore des néonicotinoïdes. Cependant, les pucerons ont la capacité de devenir résistants aux diverses molécules chimiques qui leur sont destinées [65].
- **Lutte biologique** : La lutte biologique repose sur l'utilisation des organismes microbiens tels que les champignons, les virus et les bactéries entomopathogènes [66]. La bactérie *B. thuringiensis* est largement choisie dans la lutte microbienne pour attaquer le développement de ces populations de ravageurs. Parmi la multitude des champignons entomopathogènes on retrouve principalement ceux classés dans l'ordre des Entomophthorales chargés de maintenir l'équilibre des populations de pucerons. Les genres *Beauveria*, *Metarhizium* et *Verticillium* sont les plus utilisés pour combattre les ravageurs parmi les cinq cents espèces d'Hyphomycètes [67].

Partie II : La lutte Biologique

II.1 Introduction

La lutte biologique, par opposition à la lutte chimique qui utilise des xéno-biotiques (tout composé ou molécule n'ayant pas une origine biologique), correspond à l'utilisation d'organismes et/ou composés naturels pour détruire ou contrôler d'autres organismes nuisibles sur le plan agronomique ou au niveau d'espaces naturels [18].

Les biopesticides sont des agents de lutte biologique, et peuvent être définis comme des produits phytosanitaires dont le principe actif est un organisme vivant ou l'un de ses dérivés. Ils peuvent, donc, être constitués d'organismes (plantes, insectes, nématodes) ou de micro-organismes (bactéries, levures, champignons, virus) exerçant une activité protectrice sur les plantes vis-à-vis d'agents phytopathogènes [68].

II.2 Les champignons entomopathogènes

II.2.1. Données générales

Les champignons, faisant partie du règne Fungi, sont des organismes essentiels à la biodiversité de notre planète. Leur présence est cruciale dans de nombreux écosystèmes, où ils interagissent avec d'autres êtres vivants afin de réaliser des services écosystémiques essentiels comme la décomposition de la substance organique, la symbiose avec les plantes, ou encore la régulation des populations d'autres espèces [69]. Il s'agit d'organismes eucaryotes unicellulaires ou pluricellulaires, osmotrophes, ayant une paroi cellulaire composée de chitine, et se reproduisant de façon sexuée ou asexuée [70, 71].

Les champignons entomopathogènes, sont des champignons parasites d'insectes, ayant la capacité d'infecter une grande diversité d'insectes qui leur servent d'hôtes. Ces agents pathogènes peuvent se transmettre de trois manières différentes : i) de manière horizontale (d'une génération à l'autre par des individus infectés), ii) de manière verticale (d'une génération à une autre) iii) soit par le biais de vecteurs, Cette troisième stratégie est essentielle pour propager les champignons vers de nouveaux environnements.

La croissance des champignons entomopathogènes se décompose en deux étapes bien définies : une phase parasitaire, s'étendant de l'infection jusqu'à la mort de l'organisme hôte, et une phase saprophyte, qui se manifeste après le décès de l'organisme hôte. Par conséquent, les microchampignons entomopathogènes ont la capacité d'infuser leur hôte en l'ingérant ou en le contactant, les rendant ainsi sensibles à toutes les phases de leur développement (œuf, larve ou adulte) [72].

II.2.2. Position systématique

Les champignons entomopathogènes constituent un groupe diversifié et étendu. Ils se divisent en environ 700 espèces réparties dans une centaine d'ordres, les plus significatifs étant les Zygomycètes et les Ascomycètes. Les espèces des genres *Beauveria*, *Metharizium*, *Verticillium*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Entomophthora* et *Entomophaga* sont largement employées dans le domaine de la lutte biologique [73, 74].

a) Zygomycota (Zygomycètes) :

Il s'agit d'organismes sans flagelle qui se reproduisent par des spores et dont les cellules ne sont pas divisées par des parois. Le classement des champignons selon leur évolution a confirmé que le groupe Zygomycota était un combiné de différentes espèces. Les zygomycètes mycorhiziens ont été placés dans un nouveau groupe appelé « Glomeromycota » dans la récente classification phylogénique. Les autres zygomycètes ont été répartis dans les sous-groupes *Entomophthoromycotina*, *Kickxellomycotina*, *Mucormycotina* et *Zoopagomycotina*. Certains de ces sous-groupes pourraient être considérés comme de nouveaux groupes à part entière (ou fusionnés en partie avec un autre nouveau groupe). Les Entomophthorales (*Entomophthoromycotina*), sont très importants pour contrôler les insectes [75,76,77].

b) Ascomycota (Ascomycètes) :

Les spores de ce groupe sont élaborées dans des sacs appelés asques. Quand elles sont prêtes, elles sont expulsées à l'extérieur lorsque les asques s'ouvrent. Les Ascomycota sont divisés en trois sous-groupes, dont deux ne contiennent pas de champignons entomopathogènes. Les *Taphrinomycotina* sont des organismes qui se nourrissent de matière en décomposition ou qui peuvent infecter les plantes et les animaux [76]. De nombreuses levures sont liées aux insectes car ces derniers dispersent leurs spores [78]. Ces levures ne sont jamais nocives pour les insectes [79]. Les *Pezizomycotina* comprennent plusieurs genres qui attaquent les insectes [20], ce sont les Ascomycètes les plus nombreux et les plus complexes en termes d'apparence et d'habitat [80].

II.2.3. Mode d'action

Le développement des champignons entomopathogènes se fait à l'intérieur de leur hôte pour se nourrir, tandis que les champignons ectoparasites poussent à la surface du corps des insectes [81]. Les champignons entomopathogènes qui agissent en se développant à l'intérieur

de leur hôte et en le tuant sont appelés endoparasites. Les champignons produisent souvent des toxines en plus de leurs autres activités. Certains endoparasites, comme le *Penicillium sp*, peuvent infecter leur hôte s'il y a une blessure sur sa cuticule [82].

Deux mécanismes permettent aux champignons entomopathogènes d'envahir leur hôte :

- **Pénétration par invasion cuticulaire :** Les spores du champignon entomopathogène adhèrent à la cuticule externe de l'insecte, germent et pénètrent à travers elle, grâce à des enzymes telles que les chitinases et les glucanases qui dégradent la chitine et les glucanes, principaux composants de la cuticule [83], (**Figure 07**). Après que les champignons ont envahi l'intérieur de l'insecte, ils se développent et colonisent les tissus internes, ce qui entraîne sa mort [84].

- **Par ingestion au niveau de la cavité buccale et système digestif :** L'infection par voie intestinale est rare. Il arrive parfois que les champignons présents au sein du tube digestif de l'insecte se transforment en agents pathogènes lorsque celui-ci est soumis à des conditions de stress telles que la privation de nourriture, la chaleur excessive, une humidité élevée, etc. Par ailleurs, les enzymes digestives ou les substances fongistatiques ont la capacité de neutraliser les spores ou les hyphes des champignons non endémiques du microbiote intestinal. Dans certaines situations, l'ingestion de matière fongique peut entraîner un décès dû à une toxicose plutôt qu'à une mycose [85].

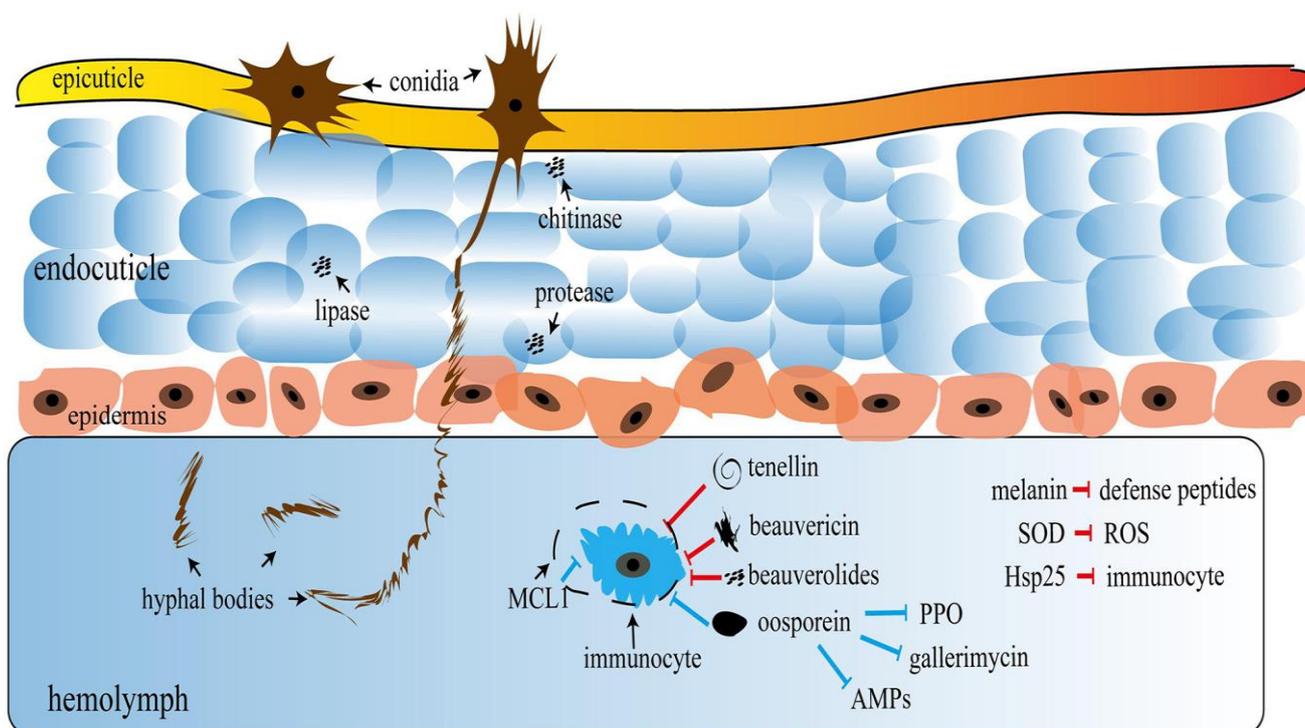


Figure 07 : Mode d'action des champignons entomopathogènes [86].

II.2.4. Facteurs de virulence

L'efficacité des champignons entomopathogènes repose sur leur potentiel infectieux, qui est influencé par les propriétés physiologiques de la population hôte et les conditions environnementales [87].

a) Facteurs liés aux pathogènes

Le pouvoir entomopathogène et le genre d'organisme hôte sont importants pour choisir un bon agent de lutte biologique. Des études ont montré que les insectes d'une même population ont une sensibilité différente en fonction des souches de *M. anisopliae*. Les tests biologiques en laboratoire sont très importants pour vérifier si les produits insecticides fonctionnent bien à grande échelle et pour contrôler leur durée de conservation [88].

b) Facteurs dépendant de l'hôte

Les insectes peuvent être sensibles aux champignons qui les infectent tout au long de leur cycle de vie. L'épizootie fongique se produit souvent lorsque la population d'hôtes est nombreuse, ce qui augmente les chances de contact entre le champignon entomopathogène et son insecte hôte, ainsi qu'entre les insectes infectés et non infectés [86].

c) Facteurs de l'environnement

Les conditions environnementales ont souvent un impact sur l'efficacité des champignons entomopathogènes envers les insectes.

c.1 Rayonnement solaire

L'action favorable des rayons du soleil représente un élément essentiel dans la survie des spores des entomopathogènes. Le fait d'être exposé à la lumière du soleil pendant quelques heures, notamment la partie UVB du spectre (285-315nm), peut entraîner une inactivation totale des conidies de *Metarhizium anisopliae* [89]. Les endroits ombragés sous les arbres aident les spores de champignons à rester plus longtemps en vie en les protégeant des radiations. La lumière peut aider certaines étapes du cycle de vie des champignons qui combattent les insectes, même si elle peut nuire à la formation des spores [90, 91].

c.2 Température

La température peut aussi influencer la germination, la croissance, la reproduction et la survie des champignons qui combattent les insectes. La température idéale pour qu'un champignon survive varie selon les types de champignons. Les spores des entomophthorales sont plus

sensibles que celles de la plupart des entomopathogènes. Les changements de température (chaud plus de 35°C et froid) influent sur la propagation des maladies chez les insectes en empêchant les spores de germer, empêchant la croissance du tube germinatif et son entrée à travers la peau de l'insecte [92,92,94]

c.3 Humidité

L'humidité de l'environnement est essentielle pour que les spores puissent germer dans la nature. Elle influence également la durée de vie et la survie des champignons entomopathogènes qui ont besoin d'au moins 95% d'humidité relative sur la surface de l'insecte pour pousser [95]. Les endroits abrités avec beaucoup d'humidité favorisent la croissance des spores [96,97,98].

c.4 Effet du sol

Le sol est un endroit où les insectes contaminés par des champignons peuvent se retrouver après être tombés des feuilles. En fait, les champignons qui poussent dans le sol sont protégés contre le manque d'eau, les rayons ultraviolets et les températures très élevées ou très basses. Il est crucial de bien comprendre les champignons qui attaquent les insectes vivent dans la nature, surtout dans le sol, pour bien les utiliser en agriculture [99,100,101,102].

II.3. Les bactéries entomopathogènes

II.3.1. Données générales

Ce sont des organismes microscopiques unicellulaires procaryotes, possédant un ADN circulaire dans leur cytoplasme. Beaucoup de bactéries ont un petit fragment d'ADN en plus, appelé plasmide [103] Plusieurs bactéries ont été découvertes comme agents utilisés en lutte biologique [104].

II.3.2. Position systématique

Les bactéries peuvent être classifiées en fonction de divers critères [105], (**Figure 08**) comme leurs propriétés biochimiques et enzymatiques, leur résistance aux antibiotiques et leurs potentiels pathogènes. Elles sont également catégorisées en fonction de leur coloration selon la méthode de Gram, de leur forme et de leur capacité à se déplacer (avec ou sans flagelles), de leur aptitude à former des spores, de leur température de prédilection pour se développer, de leurs exigences nutritionnelles, de leur mode de respiration (aérobie ou anaérobie), et de leur utilisation des diverses sources comme matière organique (C ou N). On distingue 12 catégories distinctes, établies par l'étude de leur phylogénie [103].

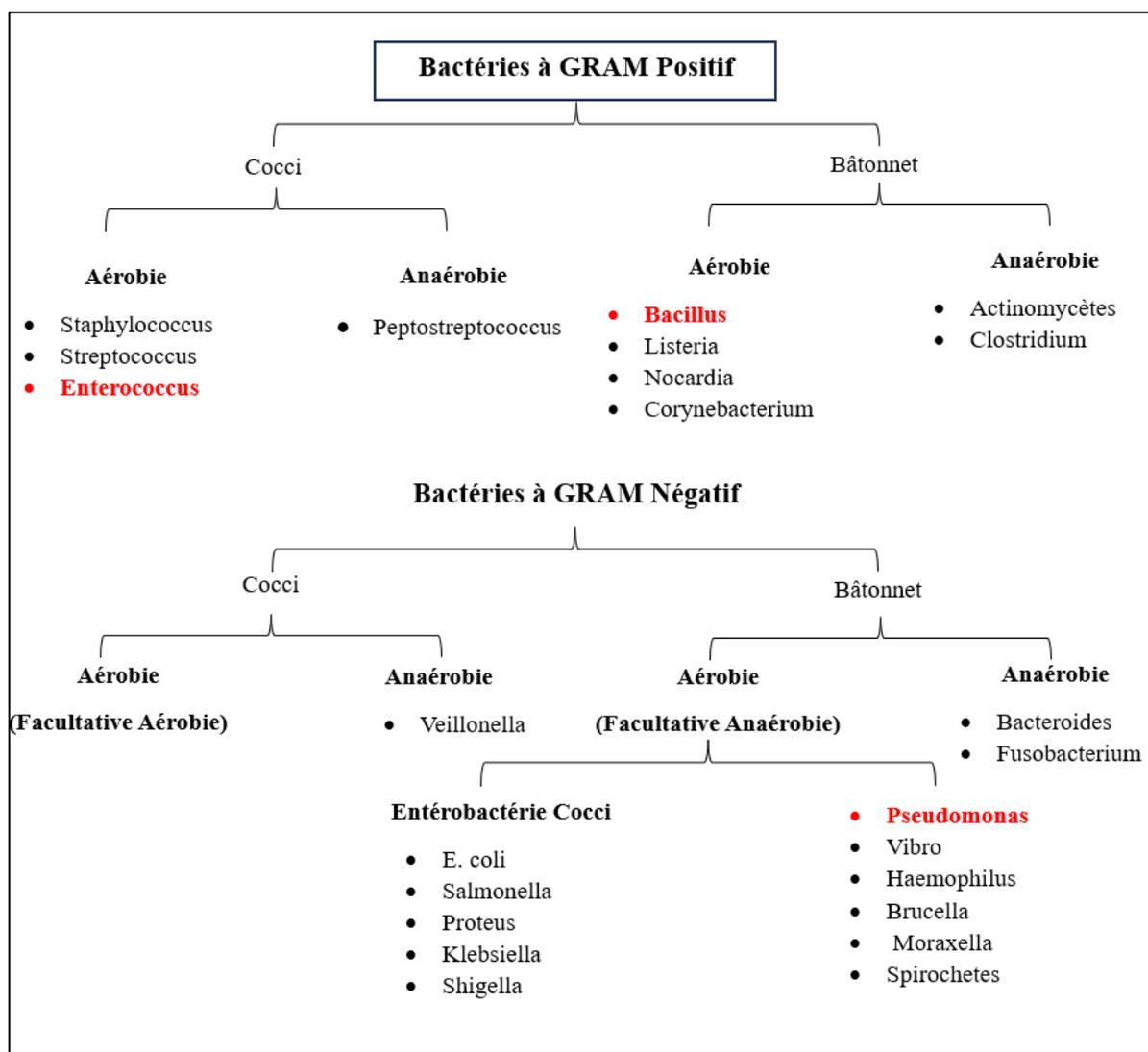


Figure 08 : La classification bactérienne [106].

Les bactéries entomopathogènes appartiennent généralement aux familles des Bacillaceae, Enterobacteriaceae et Pseudomonaceae [107]. Les genres *Bacillus* et *Pseudomonas* sont des types de bactéries bien connus pour leurs propriétés bénéfiques et utilisés dans des programmes de lutte biologique pour contrôler le développement de divers insectes ravageurs [108]. Les espèces du genre *Bacillus* à Gram positif, et *Pseudomonas* à Gram négatif, sont utilisés depuis plus de cinquante ans dans le secteur de la protection des cultures et de la foresterie pour lutter de manière naturelle contre les insectes nuisibles. Les espèces *Xenorhabdus* sp et *Photorhabdus* sp. sont à Gram négatif et sont associées aux nématodes entomopathogènes. Les chercheurs se sont basés sur l'étude des toxines insecticides spécifiques produites par ces bactéries [109].

II.3.3. Mode d'action

Une bactérie pathogène doit pouvoir entrer dans le corps de l'hôte et éviter d'être attaquée par son système immunitaire. Pour survivre et se reproduire dans l'insecte, elle produit des toxines pour contourner certaines protections naturelles. Des barrières physiques dans le corps de l'insecte (cuticule externe, la pression intestinale et la muqueuse de l'intestin moyen) les protègent contre les agents pathogènes contre une infection. Outre à cela, le corps de l'insecte utilise d'autres moyens de se défendre comme le pH de l'estomac, les protéines digestives, les substances antimicrobiennes, les récepteurs immunitaires et les bactéries présentes dans l'intestin. **(Figure 09)** [110].

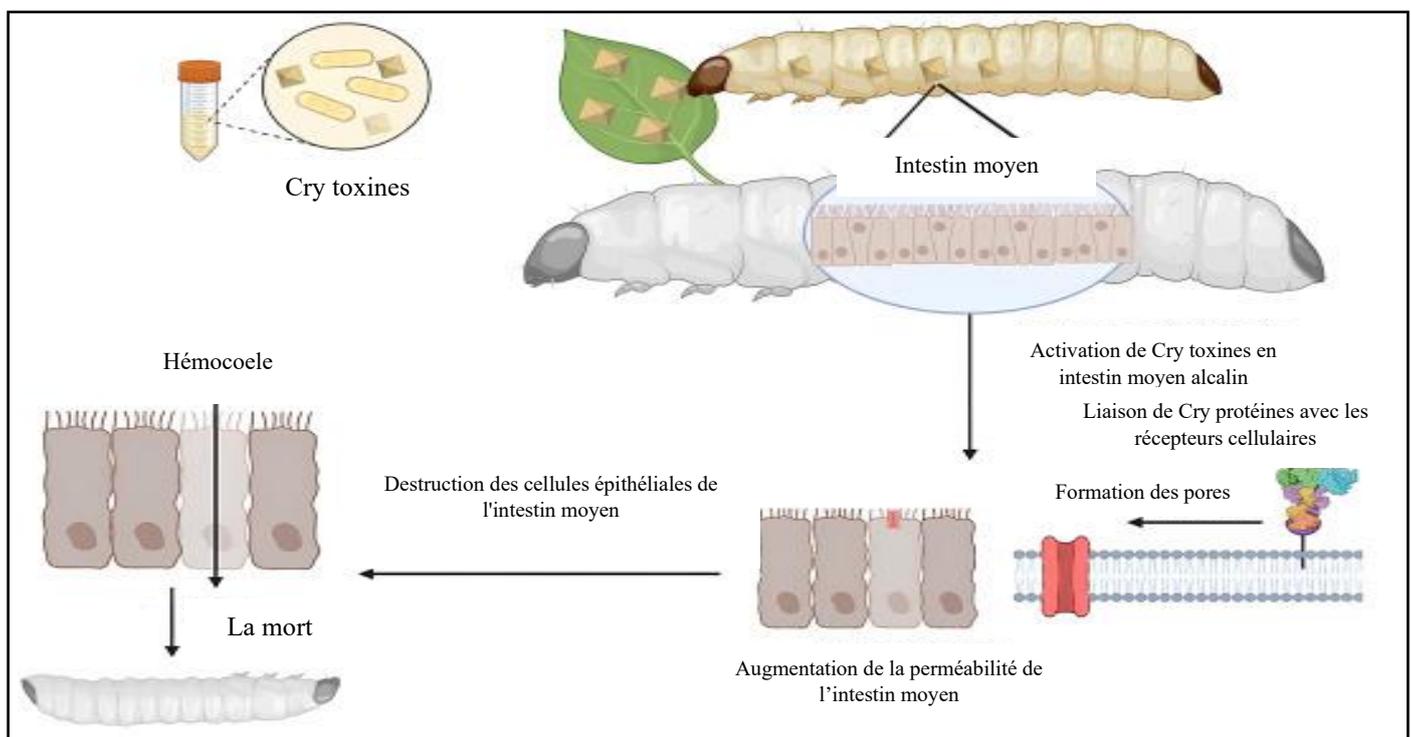


Figure 09 : Mode d'action des *Bacillus thuringiensis* sur les cellules intestinales des insectes [111].

II.3.4. Facteurs de virulence

Les mécanismes d'action des bactéries entomopathogènes sont gérés par différents facteurs de virulence, comme la production des enzymes et des protéines et la formation des spores selon le genre de bactéries entomopathogènes les plus connues pour leur potentialité insecticide.

1) La sporulation :

Divers paramètres environnementaux tels que la température, le pH, ainsi que la présence de certains ions divalents et de molécules contenant du carbone et de l'azote, favorisent la formation des spores et la cristallisation para-sporale chez *Bacillus thuringiensis* dans des

conditions variées. On peut citer des niveaux de stabilité et de résistance variables face à la chaleur, aux radiations, aux agents chimiques, à la déshydratation et à d'autres conditions environnementales défavorables [112].

2) Production de protéines

Pendant la phase de sporulation, *B. thuringiensis* produit des protéines Vip et Cyt qui agissent comme insecticides contre les insectes et les protozoaires. Ces protéines sont transportées par des plasmides et peuvent agir ensemble avec les toxines Cry. Les toxines Cyt agissent de manière similaire aux 21 toxines Cry et peuvent agir ensemble de manière plus efficace. [113,114].

a) Protéines cristallines Cry : La sporulation de la bactérie *Bacillus thuringiensis* conduit à la synthèse des toxines Cry (ou δ -endotoxines) responsables de la mort des larves d'insectes infectées. Ces dernières ingèrent par voie buccale ces cristaux de protéines qui se dissolvent et deviennent actives dans le tube digestif. Ils se fixent ensuite à des récepteurs spécifiques présents sur les cellules épithéliales de l'intestin moyen, induisant l'ouverture de pores transmembranaires et entraînant la destruction des cellules. Cette toxémie peut conduire à la mortalité des larves d'insectes [115,116].

b) Protéines VIP : Ces protéines sont synthétisées pendant la croissance de *Bacillus thuringiensis*. Il y a environ 100 toxines VIPs différentes réparties en trois groupes : le groupe des toxines Vip1 et Vip2 infectant les coléoptères, et celui des toxines Vip3 qui s'attaquent aux lépidoptères. Les VIP's s'accrochent aux cellules de la paroi intestinale et ouvrent des passages, entraînant ainsi la mort de l'insecte [117].

3) Production d'enzymes :

Les chitinases sont les enzymes les plus importantes produites par *B. thuringiensis*. Les spores et les cristaux de *Bt* sont plus facilement intégrés dans les larves grâce à la chitinase en traversant la membrane anti-microbienne [118]. Cette enzyme est responsable d'une plus grande toxicité du *Bt* en causant des pores au niveau de la membrane de l'intestin des larves, ce qui permettrait aux toxines du *Bt* d'atteindre plus facilement les récepteurs sur les cellules intestinales.

Les souches de *Pseudomonas fluorescens* ont la capacité de produire diverses exoenzymes, telles que des protéases et des lipases. De plus, elles sont également capables de produire une enzyme de type cholinestérase. Ces molécules présentent des caractéristiques qui les rendent particulièrement adaptées à être utilisées pour contrôler le développement des insectes nuisibles et contre les maladies des plantes [119,120,121].

4) Toxines

Les genres des bactéries entomopathogènes *Xenorhabdus* et *Photorhabdus* et l'espèce *Pseudomonas fluorescens* ont déjà été caractérisées et identifiées par deux toxines qui ciblent les insectes pour la première fois chez les bactéries entomopathogènes [122].

a) Fluorescens insecticidal toxin (FitD) : Les bactéries contenant le gène codant pour FitD, une toxine insecticide connue sous le nom de toxine insecticide fluorescente, sont mortelles pour les insectes infestés. En effet, ce gène constitue un élément clé de la toxicité de la souche bactérienne en question vis-à-vis des insectes ravageurs de la famille des lépidoptères, tel le ver du cotonnier africain *Spodoptera littoralis* [123].

b) Toxin complex proteins (Tc) : Les toxines Tc se composent de trois éléments essentiels, à savoir A, B et C, qui sont indispensables pour induire une toxicité complète. Le composant A agit en tant que toxine principale, les composants B et C sont perçus comme des agents potentiels, ce qui accroît la toxicité du complexe protéique. Des ensembles de gènes Tc ont été découverts chez *P. fluorescens*. [124,125].

II.4 Exemples d'utilisation des entomopathogènes en lutte biologique

En matière d'insectes nuisibles, divers micro-organismes se sont révélés être de redoutables ennemis, tels que les bactéries, les champignons ou encore les virus, agissant de manière efficace en tant qu'agents pathogènes pour les insectes [126, 42, 127]. En réalité, il y a un siècle et demi, l'idée d'exploiter ces derniers a été formulée. Actuellement, plus de 50 microorganismes entomopathogènes sont disponibles sur le marché pour être utilisés principalement dans le cadre de la lutte biologique augmentative [128,129].

II.4.1. Utilisation des champignons entomopathogènes en lutte biologique

Les organismes microbiens ont la particularité d'agir sur toutes les étapes de croissance de l'insecte, y compris sur les œufs [130, 131]. En 1994, des chercheurs ont anticipé une avancée importante dans l'industrialisation et la culture de ces champignons. Grâce aux avancées récentes en biotechnologie, environ cent soixante-dix bio insecticides fabriqués à partir de champignons entomopathogènes sont utilisés dans la lutte biologique contre divers ordres d'insectes ravageurs [132, 133].

II.4.1.1. Exemple d'utilisation :

A) *Beauveria bassiana* : *Beauveria bassiana* est un champignon entomopathogène appartenant à l'ordre des Hypocreales et à la famille des Clavicipitaceae, largement utilisé en lutte biologique pour contrôler les populations d'un grand nombre d'insectes différents, couvrant ainsi une large variété de cibles potentielles d'insectes nuisibles. Cette espèce est

connue pour causer une maladie appelée la muscardine blanche chez les insectes, ce qui en fait un outil efficace pour la gestion des ravageurs. Lorsque l'individu est infecté, on peut observer qu'il est entièrement recouvert d'une épaisse couche de mycélium blanc. Cette espèce, grâce à sa capacité d'action étendue et à sa forte virulence, est capable d'infecter son hôte par un simple contact, sans avoir besoin de conditions particulières [134].

Au sein de l'ordre des lépidoptères, il a été démontré que 23 isolats de *B. bassiana* étaient efficaces pour contrôler les larves au troisième stade de développement de la tordeuse à bandes obliques, *Choristoneura rosaceana*, de la famille des Tortricidae [135]. Des études récentes portant sur différentes espèces faisant partie de l'ordre des coléoptères ont mis en évidence le potentiel de *Beauveria bassiana* à provoquer un taux de mortalité significatif chez divers insectes ravageurs des cultures [136].

B) *Metarhizium anisopliae* : *Metarhizium anisopliae*, a été le tout premier agent pathogène à être consciemment utilisé dans le but de lutter contre les insectes nuisibles. Cette espèce a la particularité de pouvoir infecter son hôte non seulement par ingestion, mais aussi par simple contact. Cette capacité le distingue des autres agents entomopathogènes qui, eux, nécessitent d'être ingérés par l'insecte pour provoquer l'infection. Ce mécanisme d'action spécifique rend tous les stades de croissance des insectes, y compris l'œuf, la larve et l'adulte, réceptifs et exposés aux effets de ce champignon [137].

II.4.2 Utilisation des bactéries entomopathogènes en lutte biologique :

Depuis longtemps, les bactéries entomopathogènes sont utilisées pour combattre les insectes comme lutte biologique. En effet, la plupart des bactéries employées à cette fin sont des bactéries capables de former des spores. Cette caractéristique est particulièrement avantageuse car elle facilite grandement le stockage et l'application de ces agents biologiques. Elles pénètrent dans l'organisme de l'hôte, à travers une blessure cutanée ou une plaie et sont capables de tuer l'hôte de deux manières différentes : en sécrétant des toxines, et en provoquant une septicémie [138,139].

II.4.2.1 Exemples d'utilisation :

A) Le genre *Bacillus* : Le genre *Bacillus* est largement exploité pour lutter contre les insectes nuisibles. Ce genre comprend plusieurs espèces très abondantes dans la nature, dont la plupart se développent de manière optimale à des températures comprises entre 30°C et 37°C [140]. Le premier produit bioinsecticide novateur fut commercialisé en France en 1938 sous le nom de marque "Sporeine". Il a été conçu en utilisant des spores provenant de la

bactérie *B. thuringiensis*, [129]. Cette bactérie a la capacité d'agir de manière ciblée contre les insectes nuisibles ce qui en fait un partenaire de choix pour les agriculteurs cherchant des alternatives aux pesticides chimiques [128,141,142,143]. De plus, il convient de souligner que les substances dérivées des différentes sous-espèces de *Bacillus thuringiensis* sont efficaces contre une grande variété d'organismes nuisibles tels que les lépidoptères, les diptères, les coléoptères et les acariens. En fait, ces produits représentent jusqu'à 98% des pesticides microbiens d'origine bactérienne sur le marché [128].

B) Le genre *Pseudomonas* : Depuis de nombreuses décennies, les scientifiques se sont concentrés sur l'étude des *Pseudomonas fluorescens*. Ces bactéries sont connues pour leurs multiples bienfaits, notamment l'efficacité de la lutte contre les maladies présentes au sol qui affectent les plantes. De plus, elles possèdent des propriétés entomopathogènes [144, 145].

Certaines souches de *P. fluorescens* sont des alliées de choix pour contrôler des mauvaises herbes et divers genres d'insectes ravageurs des cultures avec une importance économique à l'échelle mondiale [146, 147, 148].

Partie III : Généralités sur les citrus

III.1 Données générales

Le mot « agrume » dérive de latin agrus qui, autrefois, désignait les plantes dont les fruits ont une saveur aigre, par exemple l'ail ou les oignons. Avec le temps, sa signification évolua et il fut utilisé pour décrire un groupe de plantes de la famille des Rutacées, en particulier celles appartenant au genre de Citrus [149].

Cultivés, consommés et appréciés partout dans le monde, les agrumes sont pratiquement indispensables de par leur teneur élevée en acide ascorbique. La vitamine C. Les agrumes ont une grande importance économique, non seulement au niveau de la production du fruit (80 Millions de tonnes par ans) mais également pour d'autres secteurs, par exemple l'industrie des parfums. N'oublions pas non plus leurs caractéristiques ornementales : leur port noble, leurs feuilles persistantes d'un beau vert brillant, le parfum délicat de leurs fleurs [149].

III.2 Les agrumes dans le monde

Actuellement le nombre des pays producteurs d'agrumes dans le monde augmente progressivement, et l'agrumiculture s'observe presque dans toutes les zones du globe, essentiellement dans les régions méditerranéennes et tropicales où cette production est possible (**Figure 10**) [150].



Figure 10 : Les Principaux pays producteurs d'agrumes dans le monde [150].

En 2012/13, La production mondiale d'agrume s'élevé à 73MT et est constitué pour deux tiers d'oranges. Elle a baissé de 5% du fait principalement de la chute de la production des oranges de 9% (1.7 Millions tonnes) en comparaison avec la campagne précédente, cette situation est le résultat de la diminution de la production d'oranges du Brésil, de l'Union européenne et la Turquie comme étant les principaux producteurs d'agrumes dans le monde [151].

III.3 Les agrumes en Algérie

Selon (Aouane et Ghezli., 2001). À l'instar de l'arboriculture fruitière. l'agrumiculture occupe une place primordiale et constitue l'une des préoccupations majeures des décideurs au niveau ministre de l'agriculture algérien. Le verger agrumicole algérien occupe une superficie de 64154 ha dont 50873 ha se répartissent en majorité dans Wilaya de Blida (26%). Chlef (9%), Alger (8%). Les principales espèces cultivées dans ces régions sont les oranges, les clémentines, les citrons et pomelos. En termes de production, L'Algérie a atteint le niveau de 8 552 654 quintaux soit un rendement moyen de 16.8T/ha, les différentes composantes de cette production sont 72% pour les oranges, 16% pour la clémentine, 7% pour les citrons, 3% pour la mandarine et 0.1 % pour les pomelos [152].

III.4 Caractéristiques géographiques de la région d'étude

La Mitidja est une vaste plaine, située à une latitude Nord moyenne de 36 à 48° et une altitude moyenne de 30 et 50 mètres. Elle s'étend sur une longueur de 100 kilomètres et une largeur de 5 et 20 kilomètres. Elle couvre une superficie de 150 000 ha et correspond à une dépression allongée d'Ouest en Est. Elle est limitée à l'Ouest par l'Oued Nador, à l'Est par l'Oued Boudouaou et bordée par deux zones élevées ; le Sahel au Nord et l'Atlas Tellien au Sud. Elle ne s'ouvre que sur quelques kilomètres sur la mer Méditerranée (**Figure 11**) [153].

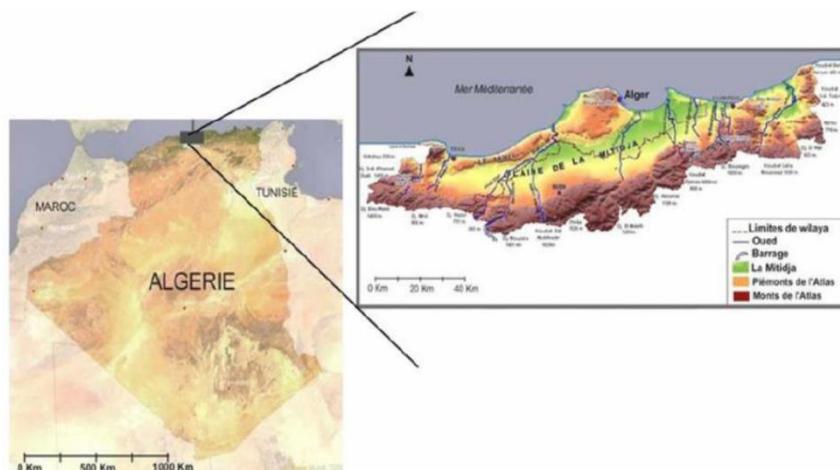


Figure 11 : Localisation géographique de la plaine de la Mitidja [154].

III.5. Biodiversité microbienne des vergers d'agrumes

Trop souvent considéré comme un environnement minéral, le sol est aussi un lieu de vie. Il héberge une très forte diversité d'organismes vivants, notamment les microorganismes. Un gramme de sol contient entre 100 millions et 1 milliard de microorganismes sans oublier toute la vie macro organique (faune, flore...) que le sol héberge. Tous ces organismes font partie intégrante du système du sol et participent par leurs activités à la formation et à l'évolution des sols [155].

Chapitre II : Matériels et Méthodes

Objectif

Ce travail de recherche a été mené au sein du Laboratoire de Recherche sur les Plantes Médicinales et Aromatiques (LRPMA), à l'Université Saad Dahlab Blida-1 (USDB-1). Il s'est principalement focalisé sur l'isolement et l'identification de souches microbiennes dans le but de déterminer et leur potentiel insecticide contre les deux insectes ravageurs cibles.

II.1. Matériel biologique et non biologique

Le matériel biologique utilisé dans notre expérimentation est composé de trois éléments. Le matériel microbien est représenté par des souches fongiques et bactériennes. D'une part, Les isolats fongiques ont été obtenus à partir de cadavres d'insectes ravageurs (**Figure 12**), rencontrés dans différents vergers d'agrumes prospectés dans la région agrumicole de la wilaya Blida,



Figure 12 : Cadavre d'un aleurode (Insecte, Homoptera) infesté par des champignons

D'autre part, les souches bactériennes étudiées ont été isolées du sol de ces mêmes vergers de citrus.

Deux espèces aphidiennes ont été choisies pour être utilisées comme cibles lors des essais de pathogénicité avec les isolats fongiques et bactériens testés. Il s'agit du puceron noir de la fève *Aphis fabae* (**Figure 13. a**) et du puceron farineux de l'abricotier *Hyalopterus pruni*. (**Figure 13. b**).



Figure 13 : Adulte aptère du puceron noir de la fève *Aphis fabae* (a), Colonies du puceron farineux *Hyalopterus pruni* sur une feuille d'abricotier (b)

Des plants de la fève cultivés en pots (**Figure 14**) ont été installés au niveau de la serre pédagogique du Département Biotechnologies et agroécologie.



Figure 14 : Plants de fève cultivés en pots sous serre

L'ensemble du matériel non biologique, produits chimiques, milieux de culture et réactifs utilisés pour mener notre expérience, est présenté au niveau de l'**Annexe 01**.

II.2. Méthodologie d'étude

II.2.1. Isolement, identification et toxicité des souches fongiques testées

II.2.1.1. Récolte des cadavres d'insectes

Les cadavres d'insectes ont été récoltés au niveau des feuilles d'arbres d'orangers dans des vergers agrumicoles situés dans la région de d'Oued El Alleug, Mouzaïa, Bougara, Beni Mered et Tabainat au niveau de la Wilaya de Blida, Algérie. Les feuilles disposants des insectes morts sont acheminées au laboratoire, et à l'aide d'une loupe binoculaire, nous avons prélevé ces cadavres pour l'étape de l'isolement. Cette méthode d'isolement a été préalablement utilisée et validée dans des recherches antérieures. Goettel *et al.*, ; Lakhdari *et al.*, [156,157] ont souligné que les champignons entomopathogènes sont généralement isolés directement de cadavres d'insectes.

II.2.1.2. Isolement

Les cadavres d'insectes ont été désinfectés pendant 2 minutes à l'eau de Javel (2°), suivi par trois rinçages à l'eau distillée stérile, puis un séchage entre deux papiers stériles. Ils sont ensuite placés dans des boîtes en verre avec du coton humide puis incubés pendant 4 à 5 jours à 25°C, dans le but de favoriser le développement des champignons [158]. Une fois que le mycélium apparaît sur les cadavres des insectes (**Figure 15**), ces derniers sont mis en culture dans un milieu PDA, et incubés une seconde fois pendant 5 jours à 25°C.



Figure 15 : Développement du mycélium.

II.2.1.3. Purification et identification des isolats fongiques

Les mycéliums des isolats fongiques développés sur le milieu PDA ont été purifiés par la réalisation de repiquages successifs nécessaires jusqu'à l'obtention d'une souche pure, confirmée par l'observation macroscopique et microscopique. Les boîtes ont été incubées à 28°C. La lecture est faite chaque 48h, jusqu'à l'obtention d'une souche pure et bien développée puis identifiés selon leurs caractéristiques macroscopiques microscopique et moléculaire.

a). Détermination macroscopique et microscopique

L'identification macroscopique est réalisée dans un environnement bien éclairé à travers l'observation attentive de l'aspect et de la couleur de l'isolat fongique purifié. Tandis que l'identification microscopique a été basée sur la détermination de la forme du mycélium et des spores à l'aide du microscope optique en se basant sur des clés recommandées de l'identification des champignons. L'identification de ces souches étant basée essentiellement sur les clés de détermination des genres à savoir les caractères cultureux et la morphologie microscopique, établies par [159,160,161].

b). Identification moléculaire

L'identification moléculaire des isolats fongiques sélectionnés a été effectué à travers d'une prestation de service au niveau du laboratoire privé Gene Life qui est situé à la wilaya de Sidi Bel Abbès en Algérie. Où est basée sur l'amplification et le séquençage des gènes codant pour l'ITS (Nuclear ribosomal Internal Transcribed Spacer) et EF1 (Elongation factor 1-alpha). La région ITS, est une région transcrite mais non codante qui sépare le gène AND codant de l'ARN [162], elle représente environ 600 pb. Le gène EF1-alpha comprend environ 1 600 pb avec trois introns, il code pour le facteur d'élongation 1-alpha.

L'extraction de l'ADN a été menée en utilisant le kit commercial NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel Germany).

- **b1. Amplification (Polymérase Chaîne Réaction)**

Les PCR ont été effectuées dans un volume réactionnel de 25 μ L contenant 2 μ L de matrice ADN, 5 μ L Tampon de Taq Solis Biodyn (5 X), 1,5 μ L $MgCl_2$ (25mM), 0,2 μ L de solution de dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) (25mM), 1 μ L solution de chaque amorce (Amorce F, Amorce R), 0,2 μ L Taq polymérase Solis Biodyn et de l'eau ultrapure et 14,1 μ L pour compléter jusqu'à 25 μ L.

Les régions ITS et EF de l'ADNr nucléaire ont été amplifiées par PCR à l'aide d'une paire d'amorce spécifique des champignons ITS1/ITS4 et EF-728F/ EF-2. ITS1 (5' CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A 3') et ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') [163]. EF-728F (5' CAT YGA GAA GTT CGA GAA GG 3') et EF-2 (5' GGA RGT ACC AGT SAT CAT GTT 3') [164].

La PCR a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur (iCycler Bio-Rad, USA), selon les étapes suivantes : i) Dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min et cette étape se déroule en 35 cycles ii) Dénaturation à 95°C pendant 30 min, iii) Hybridation des amorces à 55-52°C pendant 30 min, iv) Elongation à 72°C pendant 45 min suivie directement par une élongation finale pendant 7min à la même température. Les produits de la PCR seront stockés à 10°C jusqu'à utilisation.

- **b2. Électrophorèse sur gel d'agarose**

Les produits d'amplification ont été mis en évidence suite à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% d'un échantillon de 10 μ l contenant les produits de PCR. La migration est suivie d'une coloration dans une solution de bromure d'éthidium (0,5 μ g/ml). Ainsi, l'ADN a été observée et photographiée sous lumière ultraviolette en utilisant le système Gel doc de la société Biorad (États-Unis).

- **b3. Séquençage et l'analyse des séquences**

Les produits PCR ont été purifiés par le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up de Macherey-Nagel (Germany). Ensuite, ils ont été séquencés par la technique de Sanger [165], en utilisant le kit BigDye v3.1 d'Applied Biosystems et les amorces PCR utilisées pour l'amplification des fragments d'intérêt. Les séquences obtenues sont analysées et nettoyées par l'utilisation du logiciel CHROMAS PRO.

Les séquences finales sont alors comparées avec celles de la banque de données GeneBank par l'utilisation du Programme BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Blast) de NCBI pour l'identification des isolats étudiés en se basant sur le pourcentage d'homologie avec les souches de références.

II.2.1.4. Etude de l'effet des isolats fongiques contre les deux espèces d'aphides

Nous avons testé les solutions fongiques sur les deux d'aphides, afin d'évaluer leurs effets insecticide et entomopathogène. Les essais biologiques ont été effectués au laboratoire (*in vitro*) ainsi que sur le terrain dans des conditions naturelles

II.2.1.4.1. Préparation des solutions fongiques

La méthodologie suivie (**Figure 16**) pour la préparation des suspensions fongiques testées, a été réalisée en prenant soin de maintenir le plus possible des conditions aseptiques.



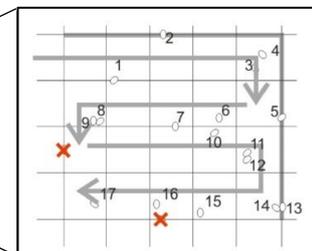
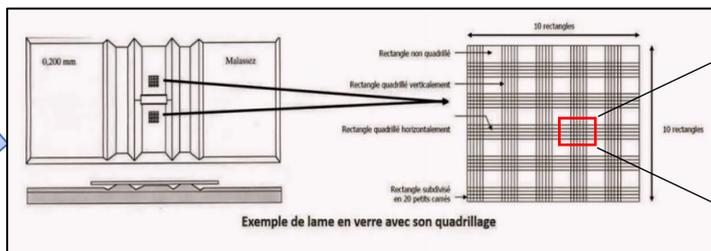
i) Toutes les pratiques ont été réalisées dans des conditions stériles à l'aide d'un bec Bunsen, garantissant ainsi des conditions optimales pour nos



iii) Ensuite, nous avons introduit ces fragments de chaque souche dans un tube qui contient une quantité d'eau distillée stérile avec un volume de 0,02 % (v/v) de tween 80 pour une libération maximale des spores, suivi d'une agitation par vortex



ii) Tout d'abord, nous avons raclé quelques fragments de mycélium fongique à partir des cultures de 7 à 14 jours incubées à 25°C.



Après, nous avons déterminé et calculé les concentrations des solutions fongiques en utilisant une cellule de Malassez. Où Nous avons compté toutes les cellules du rectangle en suivant le sens indiqué et celles qui se trouvent sur le bord supérieur et droit.

Figure 16 : Préparation des suspensions fongiques.

Après avoir compté les spores, nous avons utilisé la formule suivante pour trouver la concentration de chaque souche fongique :

$$\text{Nombre de cellules par unité de volume (spore/ml)} = \frac{\text{Nombre de cellules comptées}}{\text{Nombre d'unités de comptage} \times \text{Volume d'une unité de comptage}} \times \text{Facteur de dilution}$$

II.2.1.4.2. Concentrations utilisées :

Dans un premier temps, une seule concentration de solution fongique par isolat a été appliquée dans les deux modalités de traitement (par trempage et par contact) sur les deux populations d'espèces aphidiennes, afin de sélectionner la souche fongique la plus efficace contre *H. pruni* et *A. fabae*.

Respectivement, les concentrations 2.2×10^7 spore/ml *in vitro* ; 2.4×10^7 spore/ml *in vivo* ont été utilisées sur *H. pruni* et 2.4×10^7 spores / ml *in vitro* ; 3.6×10^7 spores / ml *in vivo* contre *A. fabae*. Puis dans un deuxième temps, d'autres bio essais ont été menés avec différentes concentrations d'une souche plus efficace donnée.

II.2.1.4.3. Tests d'entomopathogénicité contre le puceron farineux *H. pruni*

Des feuilles de pêcher et d'abricotier infestées par le puceron *H. pruni* ont été collectées au niveau de plants fruitiers cultivés à la station expérimentale de l'Université Saad Dahlab Blida-1 (**Figure 17**).



Figure 17 : Les arbres d'abricotiers infestés par le puceron farineux à la station expérimentale de l'Université Blida 1.

a). Bioessais par trempage des feuilles *in vitro*

Tout d'abord, Dans une 1^e étape, des feuilles d'abricotier saines ont été soigneusement désinfectées à l'eau de Javel (2^o), puis rincées trois fois à l'eau distillée stérile, et ensuite séchées sur des papiers stériles (**figure 18**).



Figure 18 : Désinfection des feuilles saines d'abricotier.

Dans une 2^e étape, ces feuilles ont été immergées pendant 2 minutes dans la solution fongique préparée (**figure 19. a, b et d**) puis disposées directement dans des boîtes de Pétri stériles avec un disque de coton stérile imbibé d'eau stérile pour assurer la préservation de la vitalité de la feuille. La 3^e étape consiste à déposer à partir de feuilles infestées, 15 individus adultes de *H. pruni* sur chacune des feuilles (**figure 19. c**) Trois répétitions ont été considérées pour chaque solution fongique. Où cette méthode est aussi recommandée par Food and Agriculture Organisation en tant que procédé classique pour repérer et évaluer la tolérance des pucerons aux produits insecticides [166].

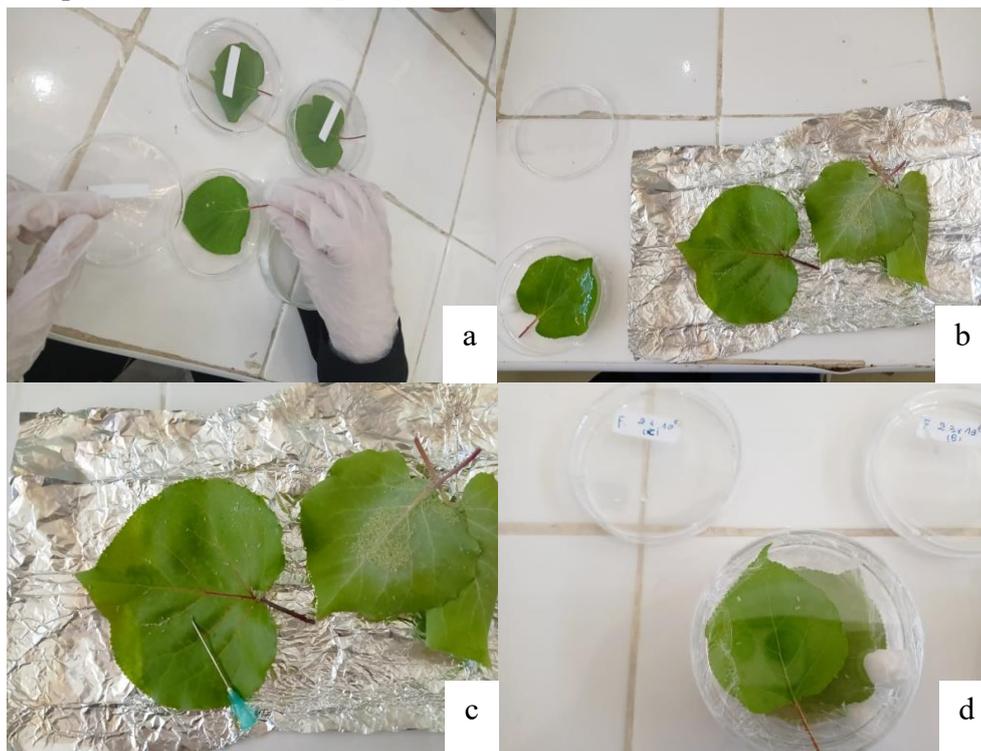


Figure 19 : Immersion des feuilles d'abricotier dans les solutions fongiques (a) ; (b), et infestation les feuilles par les pucerons *H. pruni* (c) ; (d).

b). Bioessais par contact sur arbre d'abricotier dans les conditions naturelles

Dans ces bioessais, nous avons procédé à l'application de la méthode de contact directement sur un arbre d'abricot dont le feuillage est fréquemment infesté de pucerons *H. pruni* pendant le mois de mai, au niveau du département des Biotechnologies et Agroécologie de la Faculté SNV. Des rameaux latéraux portant des feuilles infestées par des colonies denses de pucerons ont été choisis. Les solutions fongiques sont ensuite pulvérisées (**Figure 20. a**) sur les feuilles infestées lesquelles sont recouvertes de tissu moustiquaire, (**Figure 20. b ; c**), afin de les préserver des fourmis ou de toute autre attaque parasitaire.



Figure 20 : Application des solutions fongiques sur les feuilles infestées par le puceron *H. pruni*.

II.2.1.4.4. Tests d'entomopathogénicité contre le puceron noir de la fève *Aphis fabae*

Les individus du pucerons *Aphis fabae* utilisés dans cette étude ont été collectés à partir de deux sites principaux : à la région de Meftah wilaya de Blida au niveau des plantes infestées cultivées localement dans un champ de fève (**Figure 21.a**) et à la station expérimentale de l'Université de Blida (**Figure 21.b**) dans une petite parcelle expérimentale de fève. La collecte des pucerons a été réalisée en utilisant un pinceau fin pour ne pas tuer ou blesser les individus à tester.



Figure 21 : Plantes de fèves infestées par *Aphis fabae* à Meftah (a) et à la station expérimentale de l'USDB-1) (b).

a). Bioessais par trempage des feuilles de fève *in vitro*

Au début, les feuilles et les tiges de fèves ont été soigneusement désinfectées à l'eau de Javel (2°), avec rinçage à l'eau distillée stérile trois fois, puis séchées sur des papiers stériles. (**Figure 22**),



Figure 22 : Désinfection des feuilles et tiges de fève.

Les feuilles et les tiges ont été immergées dans les solutions d'isolat fongique préparées (**Figure 23. a ; b**). Trois répétitions ont été effectuées avec une quinzaine d'individus de puceron (*Aphis fabae*) placés dans des boîtes de Pétri stériles (**Figure 23. c ; d**), avec un disque de coton stérile imbibé d'eau stérile qui a été ajouté pour maintenir la turgescence du matériel végétal.



Figure 23 : Immersion des feuilles et des tiges de fève dans les solutions fongiques (a) ; (b). Disposition des feuilles de fève disposants de pucerons *A. fabae* dans les boîtes de Pétri avec du Coton (c) ; (d).

b). Bioessais par contact sur les plants de fève dans les conditions naturelles

Les plants de fève ont été obtenus à partir d'un semis de graines de fève après les avoir imbibés dans de l'eau pendant 24 heures afin de favoriser la germination. Dès que les graines ont germé, elles ont été transférées dans des pots en plastique contenant un mélange de sol et de tourbe puis irriguées régulièrement tous les 2 à 3 jours selon les conditions de température en serre. Au stade de croissance des plants à 7-10 feuilles (**Figure 24**), des colonies de pucerons *A. fabae* prélevées de plants de fève au champ (Région de Meftah et Station expérimentale de l'Université de Blida1) ont servi pour l'infestation des plants de fève en pots. À l'aide d'une épingle, 15 individus des pucerons ont été déposés avec soin sur chaque plant (**Figure 25**).



Figure 24 : Etapes de la culture de la fève en pots sous serre, de la germination à la croissance.



Figure 25 : Méthode d'infestation des plants de la fève par les pucerons.

Au laboratoire, toutes les parties des plants de fève infestés ont été pulvérisées de façon homogène avec les solutions de traitement (fongique et insecticide), à raison de trois répétitions pour chaque solution utilisée. Chaque pot contenant un plant de fève a été recouvert d'un tissu moustiquaire et déposé à l'extérieur dans une zone éclairée (**Figure 26**). Un total de 18 plants ont été utilisés dans cette modalité de traitement par contact.

Nous avons pris en considération trois plants comme témoin négatif et pulvérisés avec de l'eau distillée stérile. Le témoin positif était constitué de trois plants de fève traités avec un insecticide chimique conventionnel dilué à une concentration de 0,07 ml dans 10 litres (**SIVANTO, Bayer CropScience**). Enfin, trois autres plants de fève ont été pulvérisés par les solutions de traitement fongique pour chaque solution.



Figure 26 : Expérimentation de pulvérisation sur plantes de fève avec différentes solutions et couverture de protection.

II.2.1.5. Confirmation des souches fongiques testées à partir des cadavres de pucerons expérimentés

Après les lectures journalières des mortalités aphidiennes et pour s'assurer que les souches fongiques utilisées dans les bio-essais sont responsables de la mortalité observée nous avons

réisolé les souches concernées à partir des pucerons morts, [167]. Ces derniers sont mis dans des boîtes de pétri en verre qui contiennent un papier absorbant humidifié par l'eau distillée stérile et les boîtes sont incubées à 25°C pendant 7 jours pour créer un environnement humide qui favorise la sporulation et le développement des micro-organismes fongiques présents sur les insectes traités (**Figure 27, a**) Par la suite, les mêmes individus sur lesquels le mycélium s'est développé (**Figure 27, b, c,d**). sont mis sur un milieu PDA et incubés pendant 7 jours à 25°C.

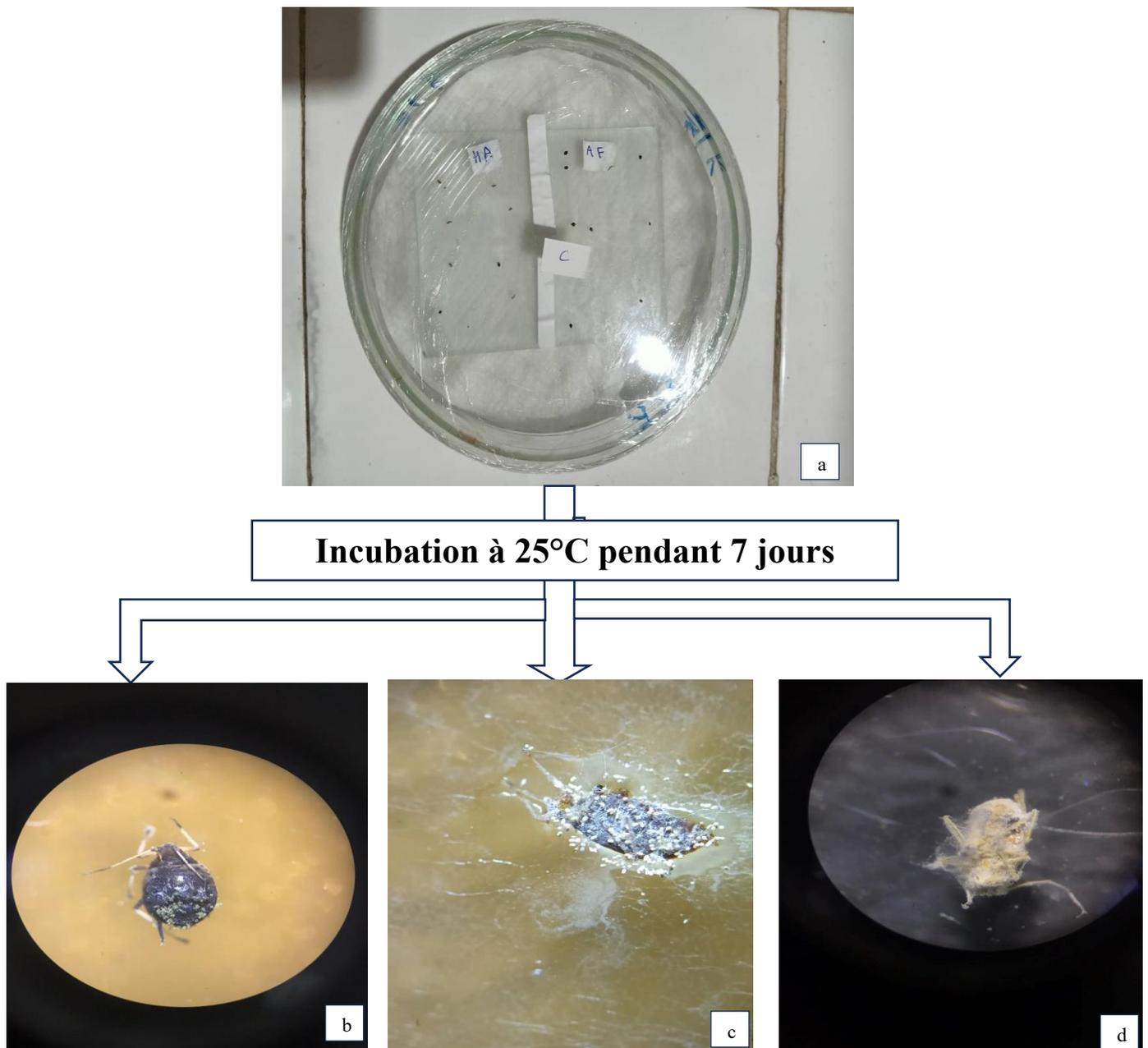


Figure 27 : Etapes de confirmation de la pathogénicité de souches fongiques testées sur les pucerons : mise en conditions humides des cadavres d'insectes (a), développement du mycélium fongique des souches utilisées sur les cadavres d'insectes incubés (b, c,d).

II.2.2. Isolement, identification et toxicité des souches bactériennes testées, à partir du sol

II.2.2.1. Echantillonnage du sol

Les échantillons du sol ont été récoltés en prélevant une quantité adéquate de sol au niveau de sites aléatoires dans des vergers d'agrumes de la région agrumicole la région de d'Oued El Alleug, Mouzaïa, Bougara, Beni Mered et Tabainat au niveau de la Wilaya de Blida, Algérie. (**Figure 28**). Ensuite, les échantillons de sol ont été mis dans des sacs étiquetés en papier puis ont été acheminés au laboratoire afin de procéder aux isolements. Les prélèvements de sol ont été effectués autour du système racinaire d'arbres d'oranger pour cibler les bactéries du genre *Pseudomonas* [168], et à une profondeur de 5 à 10 cm pour retrouver les bactéries du genre *Bacillus*, [169].



Figure 28 : Parcelles de prélèvement des échantillons.

II.2.2.2. Préparation des dilutions

Les échantillons du sol ont été soigneusement tamisés à l'aide d'un tamis fin pour de séparer le sol d'autres particules présentes dans le sol (**Figure 29.a**). Un poids de dix grammes de sol (**Figure 29.b**) a été mélangé avec 90 ml d'eau physiologique dans un erlenmeyer (**Figure 29.c**), suivie d'une agitation (**Figure 29.d**) [145].

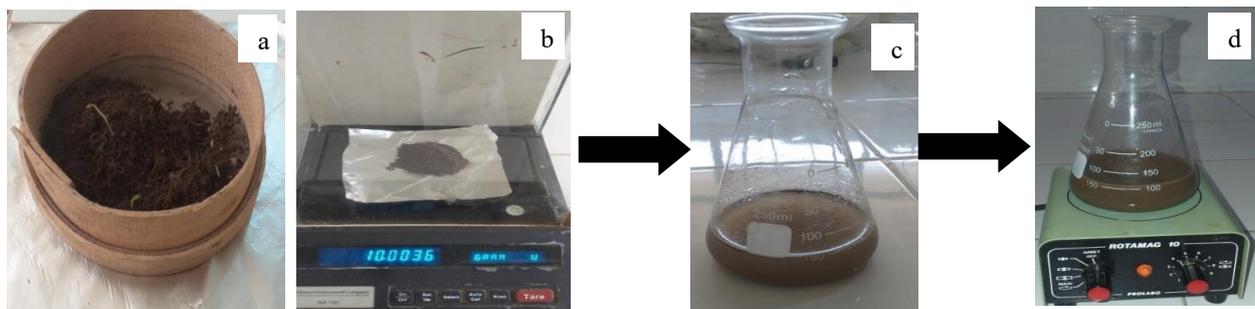


Figure 29 : Préparation des solutions mères de sol.

A partir de la solution mère de sol préparée, nous avons procédé à des dilutions successives en prenant un millilitre de mélange de sol qui est transféré, dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, pour obtenir la dilution 10^{-1} (Figure 30.a, b). Cette technique est répétée jusqu'à atteindre la dilution 10^{-6} (Figure 30.c). Les dilutions préparées sont mises au bain-marie à la température de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figure 30.d) pendant 10 minutes afin de sélectionner les bactéries du genre *Bacillus* [170].

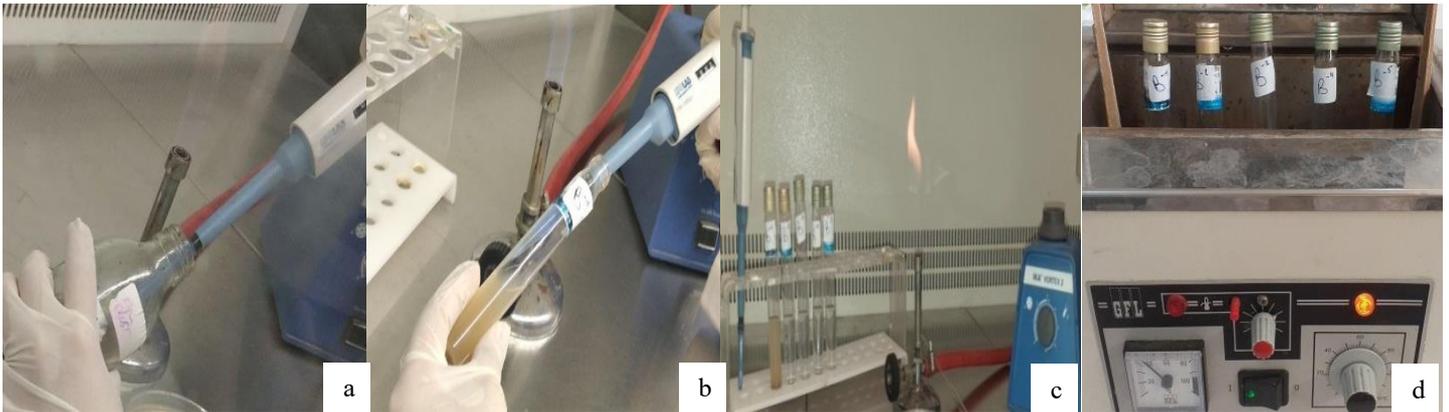


Figure 30 : Préparation des dilutions.

II.2.2.3. Isolement et purification des souches bactériennes

a). Isolement

A partir des dilutions préparées, nous avons prélevé un volume de 0.1 ml de chaque dilution que nous avons déposé sur la surface du milieu de culture à base de Gélose nutritive (GN) pour les *Bacillus* et du milieu King B qui permet la production de la fluorescéine pour les *Pseudomonas* [171] (Figure 31.a), par la technique d'ensemencement en surface (Figure 31.b et c).



Figure 31 : Etalement des dilutions du sol.

b). Purification

Sur la base des caractères morphologique de chaque genre recherché, les colonies de *Bacillus* et de *Pseudomonas* sélectionnées ont successivement repiquées jusqu'à obtenir des cultures pures. Le genre *Bacillus* est caractérisé par des colonies grandes, sèches et irrégulières (**Figure 32.a**) alors que celles des *Pseudomonas* sont assez grandes, nacrées avec un contour dentelé et une pigmentation jaune-vert (**Figure 32.b**).

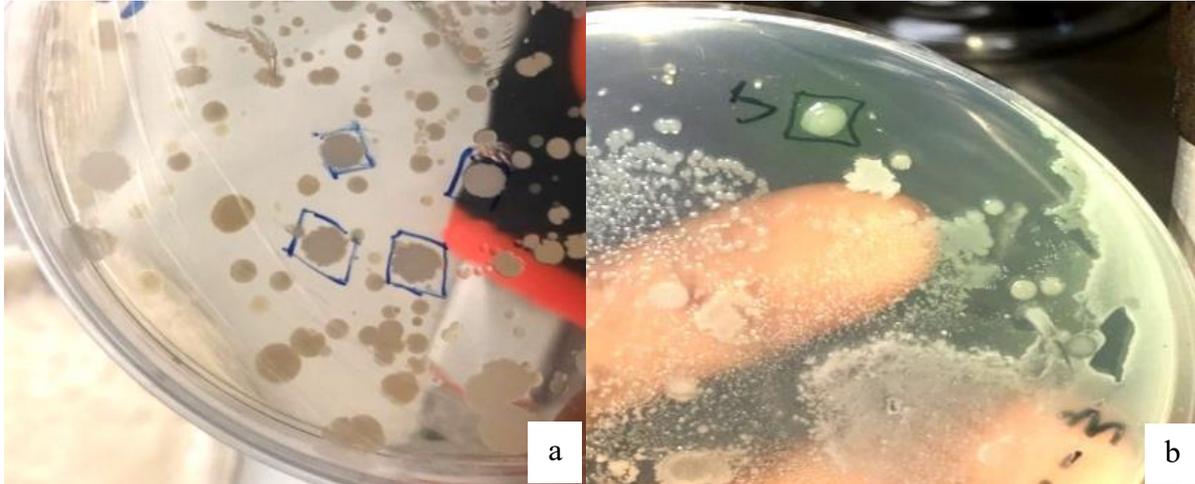


Figure 32 : Colonies suspectes de *Bacillus* (a), et de *Pseudomonas* (b).

II.2.2.4. Identification des isolats bactériens

L'analyse de divers traits macroscopiques et microscopiques, principalement liés au type des colonies, à la forme des cellules bactériennes et à leur mobilité nous a permis de les caractériser les isolats bactériens sur le plan taxonomique, physiologique et biochimique basée sur le manuel de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology via morphological, physiological and phenotypic characterization' selon Holt [172].

a). Détermination macroscopique et microscopique

L'aspect macroscopique des colonies est observé après 24 heures et 48 heures d'incubation. Le choix des colonies appartenant aux genres recherchés est réalisé en fonction des caractéristiques morphologiques de chaque genre.

La détermination microscopique est réalisée à l'aide de différents tests

- Coloration au bleu de méthylène

Ce test permet d'avoir des informations sur la forme, la taille et le mode de regroupement des bactéries observées.



Figure 33 : Coloration au bleu de méthylène

Technique : On dépose une colonie bactérienne sur une lame propre, après le séchage et la fixation du frottis on ajoute une goutte du bleu de méthylène (**Figure 33**). Laisser reposer pendant une à trois minutes. Rincer la lame à l'eau et par un papier buvard, examiner le frottis à 1000X, en utilisant l'objectif à immersion d'huile.

- Coloration de GRAM

Cette coloration permet de différencier les bactéries grâce aux propriétés chimiques et physiques de leurs parois cellulaires. Les bactéries Gram positives se colorent en violet, tandis que les bactéries Gram négatives se colorent en rouge/rose.

Technique : Préparer une lame de l'échantillon cellulaire à colorer (**Figure 34**). Fixer à chaud l'échantillon sur la lame en passant soigneusement la lame avec une goutte à travers un bec Bunsen à trois reprises. L'ajout de colorants primaire (cristal violet) et secondaire (fushine/safranine) à la lame permet de distinguer les bactéries Gram positives des bactéries Gram négatives. Si la bactérie est à Gram positif, elle retiendra le colorant primaire (cristal violet) et ne prendra pas le colorant secondaire (safranine), ce qui lui donnera un aspect violet au microscope. Si la bactérie est Gram négative, elle perd la coloration primaire et prend la coloration secondaire, ce qui la fait apparaître rouge au microscope (**Figure 35.a, b, c**).



Figure 34 : Préparation du frottis



Figure 35 : Coloration de GRAM.

- Test de catalase

L'enzyme catalase a la capacité de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en produisant de l'oxygène.

Technique : On ajoute le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à une crème bactérienne placée sur une lame (**Figure 36**). La production de bulles indiquera la présence de la catalase chez la bactérie du fait que le H_2O_2 sera décomposé en H_2O et en oxygène gazeux.

- *Test d'oxydase*

Les organismes contenant du cytochrome produisent une enzyme oxydase intracellulaire. Cette enzyme oxydase catalyse l'oxydation du cytochrome c.

Technique : On dépose quelques colonies bactériennes à ttesté sur la surface d'un disque d'oxydase (**Figure 37**). Les organismes contenant du cytochrome produisent une enzyme oxydase intracellulaire. Cette enzyme oxydase catalyse l'oxydation du cytochrome c.

- *Test sur milieu TSI*

La gélose TSI (Triple Sugar Iron) (**Figure 38**) permet la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène (H_2S) (le culot : glucose, la pente : lactose/saccharose).

Technique : On racle quelque colonie bactérienne d'une culture jeune (**Figure 39**) et par la technique des stries, on ensemence la surface de la pente avec une pique centrale à la fin (**Figure 40**). Les tubes sont placés en incubation à une température de $37C^\circ$ pendant une durée de 24 heures sans serrer le bouchon des tubes

- La fermentation du glucose : lorsqu'en anaérobiose la souche qui fermente le glucose, elle va former l'acides organiques qui acidifient le milieu et entraînent le virage du culot du rouge au jaune causé par l'indicateur du pH (rouge de phénol).
- La fermentation du lactose et/ou saccharose (sur la pente) : Cette fermentation témoigne de la production d'une béta-

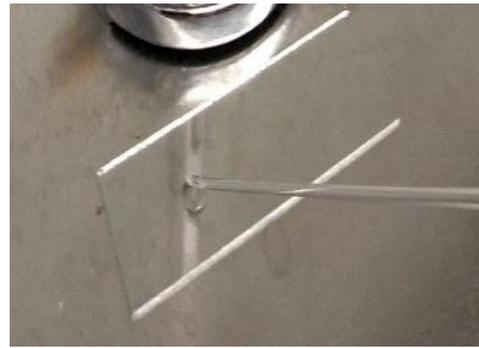


Figure 36 : Test de catalase.

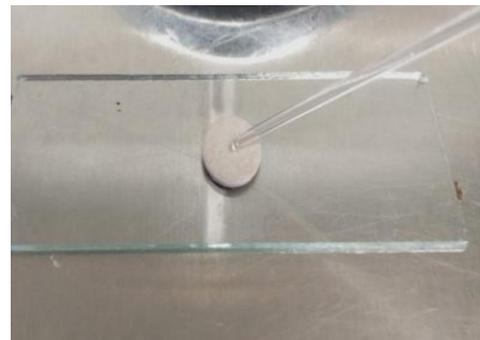


Figure 37 : Test de d'oxydase.

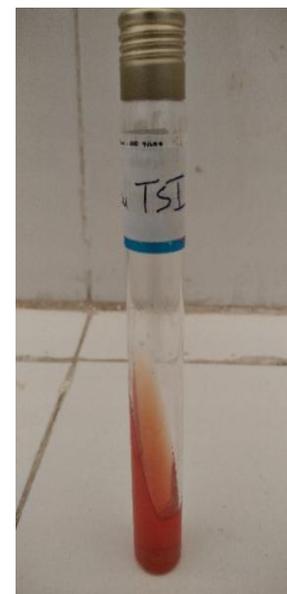


Figure 38 : Milieu TSI

galactosidase qui hydrolyse le lactose en galactose et en glucose.

- Les souches qui ne produisent pas de bêta-galactosidase (lactose -) ne peuvent pas acidifier le milieu, donc la couleur de la pente reste rouge.
- Production de gaz (CO₂) : Dans le processus fermentaire du glucose, la décarboxylation du pyruvate est à l'origine d'un dégagement de dioxyde de carbone (CO₂) dont la pression dans le tube décolle la gélose ; la souche est ainsi dite gaz (+).
- Production d'Hydrogène sulfuré H₂S : Elle est marquée par un dépôt noirâtre sur la gélose issue de sa combinaison avec les ions ferriques. L'absence de production de H₂S ne provoque pas de coloration noire du milieu.

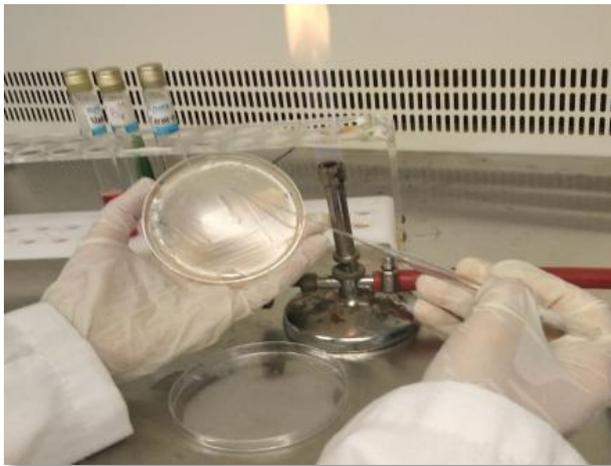


Figure 39 : Prélèvement d'une colonie bactérienne pure et jeune.

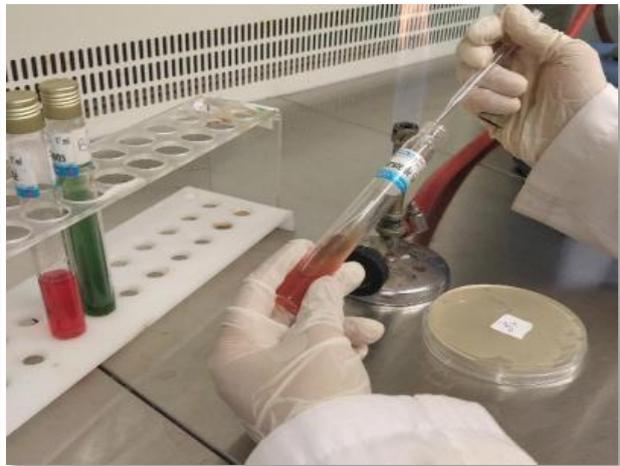


Figure 40 : Ensemencement en surface avec une piqûre centrale.

- *Citrate de Simmons*

Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone, le citrate de sodium et un indicateur du pH le bleu de bromothymol (**Figure 41**). Seules les bactéries possédant un citrate perméase seront capables de se développer sur ce milieu.

Technique : A partir d'une colonie jeune, on ensemence la pente du milieu à l'aide d'une pipette pasteur préalablement stérilisée à la flamme (**Figure 42**), isolée prélevée sur gélose nutritive. On Incube les tubes à 37 °C ± 1 °C pendant 24 heures.

- Les bactéries qui utilisent le citrate comme seule source de carbone, vont alcaliniser le milieu (Citrate +). Cette réaction est indiquée par le changement de couleur (le vert vers le bleu) causé par l'indicateur de pH.
- Les bactéries qui n'utilisent pas le citrate comme seule source de Carbone sont dites : Citrate négatif (-), la couleur reste inchangée.

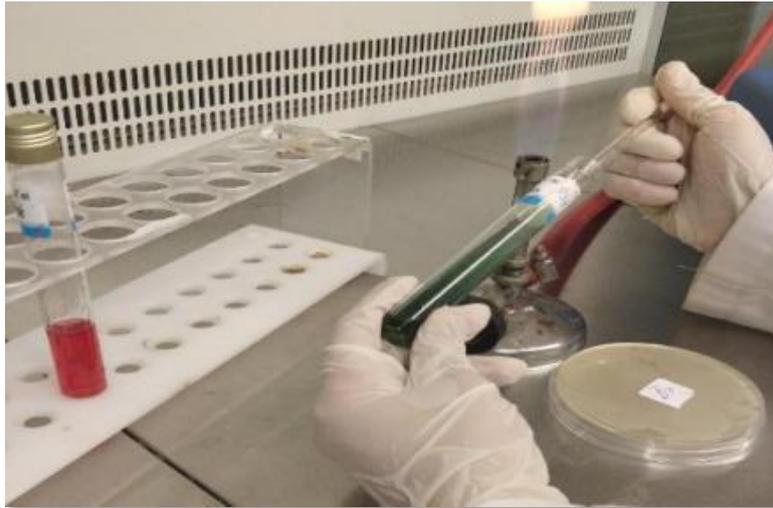


Figure 42 : Ensemencement sur le milieu citrate de Simmons.



Figure 41 : Milieu Citrate de Simmons.

- *Mannitol-Mobilité*

Le milieu Mannitol-Mobilité est utilisé pour l'identification des bactéries par la fermentation du mannitol et la mobilité de la bactérie. (**Figure 43**)

Technique : On inocule les tubes avec une culture pure en piquant le centre de la colonne du milieu à plus de la moitié de la profondeur (**Figure 44**).

Incuber les tubes pendant 24-48 heures à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ dans une atmosphère aérobie. Les bactéries mobiles vont se propager partout dans le milieu, alors que les bactéries immobiles ne poussent qu'au niveau de l'inoculation. La fermentation du mannitol produit de l'acidité dans le milieu. Le rouge de phénol est l'indicateur de pH qui détecte l'acidité en présentant un changement de couleur visible du rouge au jaune.



Figure 44 : Ensemencement par piquure centrale.



Figure 43 : Milieu Mannitol-Mobilité.

b) Identification moléculaire

L'identification moléculaire a été effectuée à travers d'une prestation de service au niveau du laboratoire privé Gene Life qui est situé à la wilaya de Sidi Bel Abbès en Algérie. Où se concentre sur le séquençage des gènes de l'ARNr 16S pour les souches performantes qui sont les plus efficaces même aux différentes doses dans cette présente étude, cette identification a été effectuée par les parties suivantes :

- **b1. L'extraction de l'ADN**

L'extraction de l'ADN génomique bactérien a été réalisée à l'aide du kit d'extraction d'acide nucléique GF-1 (Vivantis Technologies Sdn Bhd, Selangor DE, Malaisie) conformément aux instructions du fabricant. L'ADN extrait a été conservé à 4 °C jusqu'à ce qu'il soit nécessaire pour la PCR.

- **b2. Amplification (PCR)**

L'amplification par PCR a été réalisée à l'aide du jeu d'amorces du gène de l'ARNr 16S (27F : 5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3' et 1492R 5'- CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3') [173]. Le mélange de réaction PCR contenait 50 µl de master mix (1,25 U Hot Start Taq DNA Polymerase (Solis Biodyne, Estonie), 25-50 ng/µl µl de matrice ADN, 0,3 µM µl de chaque amorce, 1,5 µM MgCl₂ Chlorure de magnésium (Solis Biodyne, Estonie), et complété à 50 µl de volume de réaction avec de l'eau distillé. La PCR a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur (iCycler Bio-Rad, USA), et les cycles ont été les suivants : dénaturation initiale à 94°C pendant 12 minutes, suivie d'une autre dénaturation de 30 secondes à 94°C, d'un recuit de 30 secondes à 55°C et d'une minute et 40 secondes pour l'extension de l'amorce à 72°C. L'amplification a été répétée en 30 cycles, suivis d'une extension finale à 72 °C (7 minutes). Dans ce travail, les concentrations d'ADN ont été vérifiées à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop (NanoDrop™ 2000, USA).

- **b3. Électrophorèse sur gel d'agarose**

Après la réaction PCR, le produit PCR a été séparé dans un gel d'agarose à 1,5 % (Sigma-Aldrich, USA). Une échelle d'ADN de cent paires de bases (100 pb) (Solis Biodyne, Estonie) a été utilisée comme marqueur de poids moléculaire de l'ADN. L'électrophorèse a été réalisée à 80 V pendant 1 h 30 min et le gel a été visualisé sous lumière UV après coloration avec Midori Green Advance (Nippon Genetics, Japon) et inspecté à l'aide d'un transilluminateur UV.

- **b4. Séquençage et l'analyse des séquences**

Les produits PCR ont été électrophorés et purifiés (Clean-Up kit, Vivantis), les produits PCR purifiés ont été séquencés dans les sens direct et inverse dans des réactions séparées et en double. Chaque réaction contenait 40 µg d'ADN matrice, 2 µl de l'amorce PCR appropriée, 10 µl d'eau et 2 µl de BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems). Chaque réaction a été chauffée à 96 °C pendant 1 min, suivie de 25 cycles à 96 °C pendant 10 s, 50 °C pendant 5 s et 60 °C pendant 4 s. Les produits de séquençage ont été purifiés à l'aide d'une méthode de précipitation à l'éthanol afin d'éliminer les réactifs non incorporés et de garantir une charge neutre. Brièvement, les produits de séquençage ont été lavés dans 80 µl de mélange de précipitation à l'éthanol (3 µl de NaAc, 62,5 µl d'éthanol à 95 % et 14,5 µl d'eau) et l'ADN a été culotté par centrifugation (13 000, 15 min). Le culot a de nouveau été lavé dans 200 µl d'éthanol à 75 % et centrifugé (13 000, 5 min). L'ADN déposé a été séché à l'air et réhydraté dans 15 µl de formamide, puis chargé sur une matrice capillaire 3130 Genetic Analyzer pour la détection (Applied Biosystems). Deux séquences avant et deux séquences arrière pour chaque échantillon ont été alignées à l'aide de Bionumerics v3.5 (Applied Maths) pour obtenir une séquence composite. La qualité de chaque trace de séquence a été évaluée visuellement, et les séquences de mauvaise qualité ont été éditées et supprimées. Les séquences obtenues ont été analysées en comparant le % de similarité, en utilisant la base de données NCBI GenBank (NCBI GenBank ; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) [174]. Un arbre phylogénétique a été construit à l'aide du logiciel Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 11) [175].

II.2.2.5 Etude la toxicité des isolats bactériens contre les deux espèces d'aphides

Les isolats bactériens purifiés ont subi des tests de toxicité par une concentration homogène dans le but de sélectionner les isolats bactériens potentiellement toxiques, suivis de bioessais à différentes concentrations pour évaluer le potentiel insecticide des meilleurs isolats bactériens contre l'insecte ravageurs du puceron farineux du prunier : *Hyalopterus pruni* et les meilleures souches potentiellement toxiques ont été testé sur le puceron noir de la fève : *Aphis fabae*.

II.2.2.5.1. Préparation des solutions bactériens

On a prélevé quelques colonies bactériennes à partir d'une culture jeune (**Figure 45, a**), cette étape doit être effectuée en utilisant une pipette pasteur stérile afin de garantir des conditions stériles optimales. Puis on l'a ensemencé dans 5 ml de bouillon nutritif. Les tubes contenant les solutions bactériennes ont été incubés à 30°C avec une agitation de 200 rpm pendant 48 heures pour favoriser la formation de spores et de cristaux [176]. Par la suite, 1 millilitre de cette solution bactérienne a été transférée dans des tubes à essai avec une quantité

d'eau distillée stérile (**Figure 45, b**), suivies d'une agitation pour assurer une dispersion homogène des bactéries dans le mélange (**Figure 45, c**).

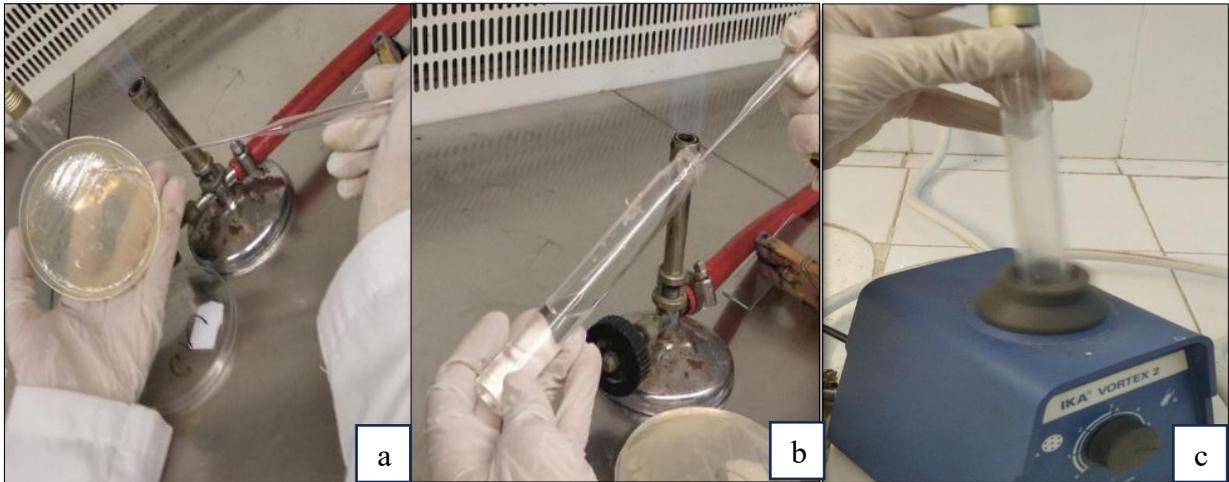


Figure 45 : Prélèvement d'une culture jeune de 18h à 24h (a), Préparation des suspensions bactériennes (b), agitation par vortex (c).

La concentration bactérienne de chaque solution a été déterminée par un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 625 nm (**Figure 46, a**), où on ajuste l'absorption entre 0,08 à 0.1 (1×10^8 UFC/ml) [177,178] (**Figure 46, b**)

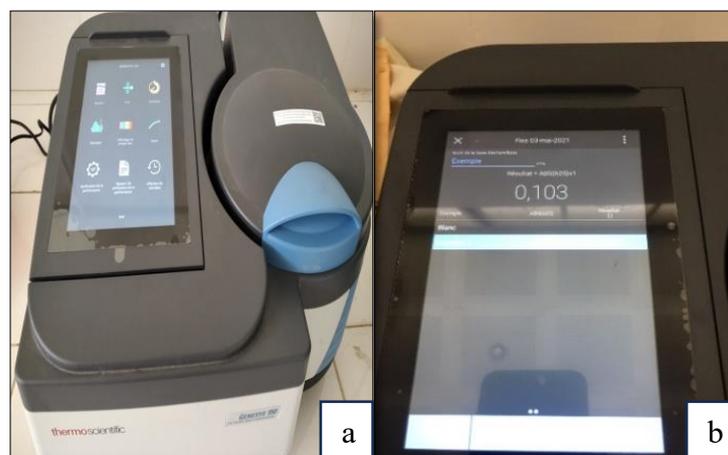


Figure 46 : Spectrophotomètre (a), La fixation de la turbidité (b).

II.2.2.5.2 Concentrations utilisées :

Dans un premier temps, une seule concentration de solution bactérienne a été appliquée contre *H. pruni* afin de sélectionner les isolats bactériens les plus efficaces selon leur pouvoir insecticide. Les isolats sélectionnés ont été testés aux différentes concentrations pour évaluer leurs potentiels insecticides sur les deux modèles d'insectes ravageurs (*H. pruni* et *A. fabae*)

a) Application par une seule concentration

Les isolats bactériens caractérisés, ont subi un des applications contre *H. pruni* par une seule concentration homogène de sélection : 1×10^8 UFC/ml

b) Application par différentes concentrations

Les isolats qui ont été efficaces dans les tests de sélection, ont été mené aux essais biologiques aux différentes concentrations : concentration 1 : 1×10^6 UFC/ml, concentration 2 : 1×10^5 UFC/ml, concentration 3 : 1×10^4 UFC/ml et concentration 4 : 1×10^3 UFC/ml. Pour les témoins, on a utilisé l'eau distillée comme témoins négatifs et les deux souches de référence *Bacillus sp. HF911367 (BT)* et *Pseudomonas sp. HF911366 (PF)* comme témoins positifs.

II.2.2.5.3 Tests d'entomopathogénicité contre le puceron farineux *H. pruni* par trempage des feuilles *in vitro*

Ces traitements ont été effectués par la méthode suivante :

- On récolte des feuilles de pêcher saines en veillant à ce qu'elles ne soient pas infestées par les pucerons. Ensuite, il est essentiel de les désinfecter pendant deux minutes dans de l'eau de javel 2° de chlorométrie, suivies aux trois rinçages. (**Figure 47**).



Figure 47 : Préparations les jeunes pousse sains.

- Les feuilles désinfectées ont été bien trempées et de toutes les côtes dans les solutions bactériennes pendant deux minutes (**Figure 48**). Par la suite, les feuilles trempées ont été disposées dans les boîtes de Petri ajoutées à un morceau de coton imbibé par l'eau distillée et les boîtes préparées sont infestées par 15 individus du puceron pour une répétition, dans l'ordre de trois répétitions (**Figure 48**). Pour le témoin négatif, on a utilisé l'eau distillée stérile et par rapport aux témoins positifs, on a utilisé deux souches de références *Bacillus sp. HF911367 (Bt)* et *Pseudomonas sp. HF911366 (Pf)* fournies

par le laboratoire de Valorisation et Conservation des Ressources Biologiques (VALCORE), Université M'Hamed Bougara – Boumerdes (Algérie) [179].



Figure 48 : Application des essais biologiques sur le puceron farineux du prunier *in vitro*.

II.2.2.5.3 Tests d'entomopathogénicité contre le puceron noir de la fève *Aphis fabae* par trempage des feuilles *in vitro*

Les souches bactériennes sélectionnées par leurs potentiels insecticides contre *H.pruni* ont été menées aux autres essais biologiques contre *A.fabae* à différentes concentrations (C1=1x10⁸ UFC/ml, C2=1x10⁷ UFC/ml, C3=1x10⁶ UFC/ml et C4=1x10⁵ UFC/ml) pour déterminer leur potentiel insecticide,

les traitements ont été appliqués par la méthode suivante :

Les feuilles et les tiges de la fève saine sont collectées, puis sont désinfectées à l'eau de Javel (2°), avec rinçages à l'eau distillée stérile trois fois. Par la suite, le matériel végétal est immergé dans la solution bactérienne afin d'assurer une imprégnation uniforme sur toutes les faces. L'eau distillée stérile est utilisée comme un témoin négatif, et les témoins positifs ont été traités par les deux souches de référence *Bacillus sp. HF911367 (BT)* et *Pseudomonas sp. HF911366 (PF)* comme témoins positifs. Ces feuilles sont mises dans des boîtes de Petri avec un morceau de coton imbibé d'eau distillée stérile et on a infesté les boîtes préparées avec 15 individus du puceron. Pour chaque répétition, les essais biologiques ont été effectués dans l'ordre de trois répétitions (**Figure 49**).



Figure 49: Application des essais biologiques sur le puceron noir de la fève *in vivo*.

II.2.3 Analyse statistique des résultats de mortalités

- Les résultats des mortalités des essais biologiques contre les deux pucerons (*H.pruni* et *A.fabae*) par les souches bactérienne et fongiques, ont été analysés pour toutes les répétitions des traitements. le taux de mortalité observé est calculé par cette formule :

$$\text{Mortalité observée \%} = \frac{\text{Nombre d'individu morts}}{\text{Nombre total des individus}} \times 100$$

- Les pourcentages de mortalité corrigés des individus morts sont ajustés selon de la formule d'Abbot [180], qui prend en compte la mortalité naturelle observée du témoin.

$$\text{La mortalité corrigée \%} = \frac{\text{La mortalité observée des populations traitée} - \text{La mortalité observée des populations témoins}}{100 - \text{La mortalité observée des populations témoins}} \times 100$$

- ❖ Les Analyses statistiques (**ANOVA**), ont été calculées par le logiciel Minitap 18.
- Les pourcentages de mortalité corrigée sont transformés en probit et représentés en fonction des logarithmes décimale des doses pour permettre d'estimer les quatre concentrations létales CL₅₀ et CL₉₀, selon la méthode de Fisher et Yates [181].

Chapitre III : Résultats

III.1. Identification, caractérisation et potentiel insecticide des souches fongiques étudiées

III.1.1. Identification macroscopique et microscopique

L'identification préliminaire des isolats fongiques a été basée sur la détermination de l'aspect macroscopique des cultures des isolats fongiques et de la forme du mycélium et des spores (Tableau 01).

Tableau 01 : Aspects macroscopique et microscopique ($G \times 40$) des isolats fongiques étudiés.

Souches fongiques	SOUCHE 1	SOUCHE 2	SOUCHE 3
Aspect macroscopique			
Aspect microscopique			

III.1.2. Caractérisation moléculaire

L'analyse BLAST des trois isolats fongiques A_ITS, B_ITS et C_ITS, a permis d'identifier les genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Akanthomyces* (*Lecanicillium/Verticillium*). Les séquences des isolats A_ITS et C_ITS étaient très similaires à celles de *Penicillium* sp et *Akanthomyces lecanii* respectivement, avec le pourcentage de similarité le plus élevé (99,82%).

De plus, les séquences des gènes ITS et EF1 de la souche B_ITS étaient très similaires (100%) à celles des espèces *Akanthomyces lecanii* et *Aspergillus citrinoterreus* (Tableau 02, Figure 49). Les isolats fongiques dans cette présente étude ont été donc identifiés), comme étant *Penicillium* sp. (A_ITS), *Aspergillus terreus* (B_ITS) et *Akanthomyces lecanii* (C_ITS) (Tableau 03).

Tableau 02 : Proposition d'identification des isolats fongiques étudiés, sur la base de l'analyse BLAST de séquences des gènes ITS et EF.

<i>Isolat</i>	<i>Suggestion d'identification GenBank</i>	<i>Similarité (%)</i>	<i>Numéros d'accession GenBank</i>
A_ITS	<i>Penicillium</i> sp. isolate ITS1F_641	99,81%	MW776250.1
	<i>Penicillium</i> sp. isolate ITS1F_517	99,81%	MW776135.1
	<i>Penicillium</i> sp. isolate ITS1F_513	99,81%	MW776131.1
B_ITS	<i>Aspergillus terreus</i> isolate SM-806	100%	PP706675.1
	<i>Aspergillus terreus</i> isolate SM-1537	100%	PP706682.1
	<i>Aspergillus citrinoterreus</i> genomic DNA sequence	100%	OW988457.1
C_ITS	<i>Akanthomyces lecanii</i> genes for 18S rRNA, ITS1	99,81%	AB079127.1
	<i>Akanthomyces lecanii</i> voucher personal collection: xinmin li:V5	99,81%	MH231312.1
	<i>Lecanicillium lecanii</i> strain ARSEF No. 6543	99,81%	EF026005.1

Tableau 03 : 'Accession number' des souches fongiques identifiées dans la base de données GenBank.

Isolates	Souches	Numéro d'accession
A_ITS	<i>Penicillium</i> sp.	PQ305246
B_ITS	<i>Aspergillus terreus</i>	PQ305247
C_ITS	<i>Akanthomyces lecanii</i>	PQ305248

L'arbre phylogénétique créé à l'aide de la méthode de Neighbor-joining (MEGA 11) (**Figure 50**) indique l'appartenance des souches fongiques étudiées à des groupes d'espèces étroitement apparentées.

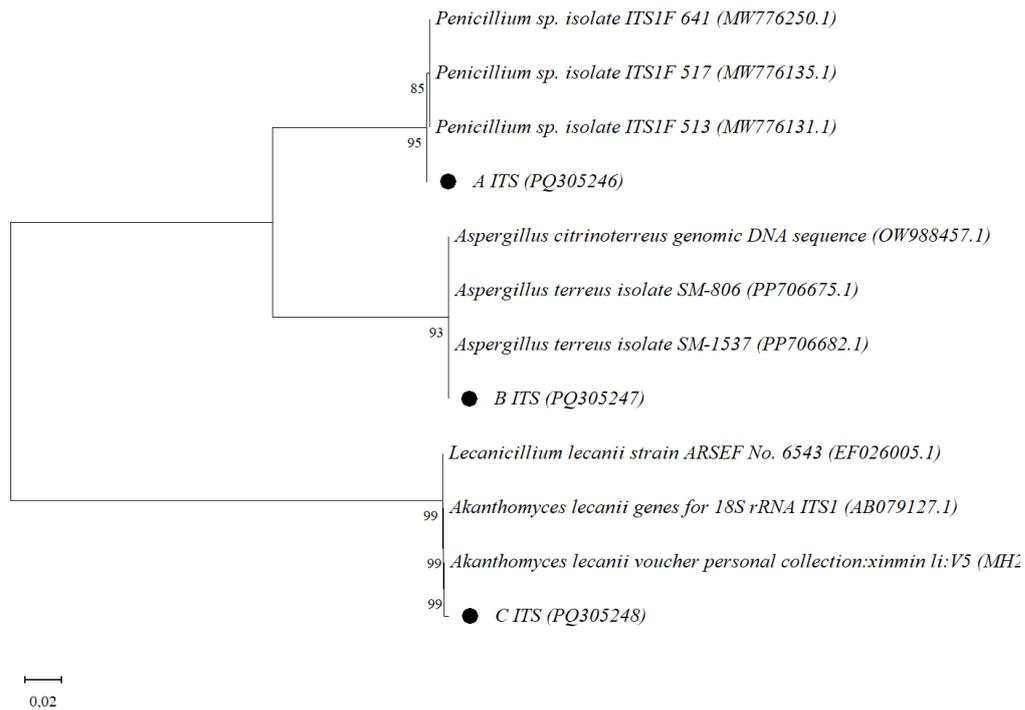


Figure 50 : Arbre phylogénétique des souches fongiques utilisant la méthode de neighbor-joining basée sur le séquençage des gènes ITS et EF 1.

III.1.3. Evaluation du potentiel insecticide des isolats fongiques étudiés

III.1.3.1. Symptômes observés sur les pucerons infestés

Les individus morts des deux espèces aphidiennes ayant été traités par les souches fongiques étudiées ont présenté des symptômes caractérisés par un retournement dorsal et un rétrécissement, accompagnés d'une déformation générale avec un noircissement de leur structure corporelle [182] (**Figure 51. a et b**). Les résultats de ces observations mettent en évidence que ces champignons peuvent induire des modifications physiologiques significatives ayant abouti à l'apparition de ces symptômes chez les deux espèces.

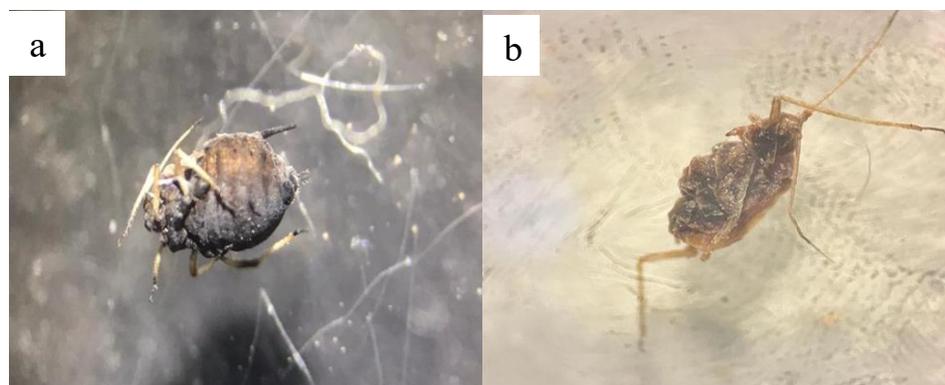


Figure 51 : Symptômes de morbidité des pucerons *Aphis fabae* (a) et *Hyalopterus pruni* (b) sous l'effet des souches fongiques étudiées (G × 2).

III.1.3.2. Effet entomopathogène sur *H. pruni*

III.1.3.2.1. Toxicité par trempage des feuilles d'abricotier *in vitro*

a)- Effet des concentrations

L'ANOVA de la comparaison des moyennes de mortalités corrigées des pucerons *H. pruni*, sous l'effet indirect des trois souches fongiques a révélé une différence très hautement significative ($F = 15,36$, $p = 0,000$ ($p < 1\%$) selon le temps, mais pas de différence selon la souche ($F = 1,83$, $p = 0,169$, $p > 5\%$).

Les trois souches semblent induire un effet similaire qui se traduit par l'infestation des individus et leur mortalité. Par contre, les mortalités augmentent du 1^{er} au 10^e jour et deviennent élevées notamment entre le 8^e et le 10^e jour (**Figure 52**), quelque soit la souche fongique. Le test de Tukey fait apparaître 5 groupes homogènes avec des taux de mortalités différents (**Figure 51**).

Globalement, le groupe a est significativement différent du groupe bc et du groupe c, alors que les groupes ab, abc et bc sont relatifs à des mortalités très variables.

- **Le Groupe a** : concerne le taux de mortalité le plus élevé qui est compris entre 65% et 70% et dû aux souches fongiques A, B et C au jour 10, il est de 66% pour la souche B au jour 9.
- **Le Groupe ab** met en évidence des mortalités moyennes de 55% au jour 9 dues à la souche C, inférieures cependant à celles du groupe a.
- **Le Groupe abc** indique des mortalités de *H. pruni* sous l'effet des souches A, B et C avec des pourcentages qui varient entre 20% et 50% aux jours 1, 4, 5, 6, 7 et 8.
- **Le Groupe bc** concerne des taux faibles de mortalité engendrés par les souches A B et C variant entre 4% et 12% du 1^{er} au 5^e jour.
- **Le Groupe c** : La souche C présente les taux de mortalité les plus bas du jour 1 au jour 4

Nos résultats indiquent que les trois isolats fongiques étudiés présentent un taux de mortalité élevé (supérieur à 65 %) sur le puceron *H. pruni*, au bout de 10 jours après application des traitements fongiques sur les feuilles à la concentration initiale de 2.2×10^7 spore/ml.

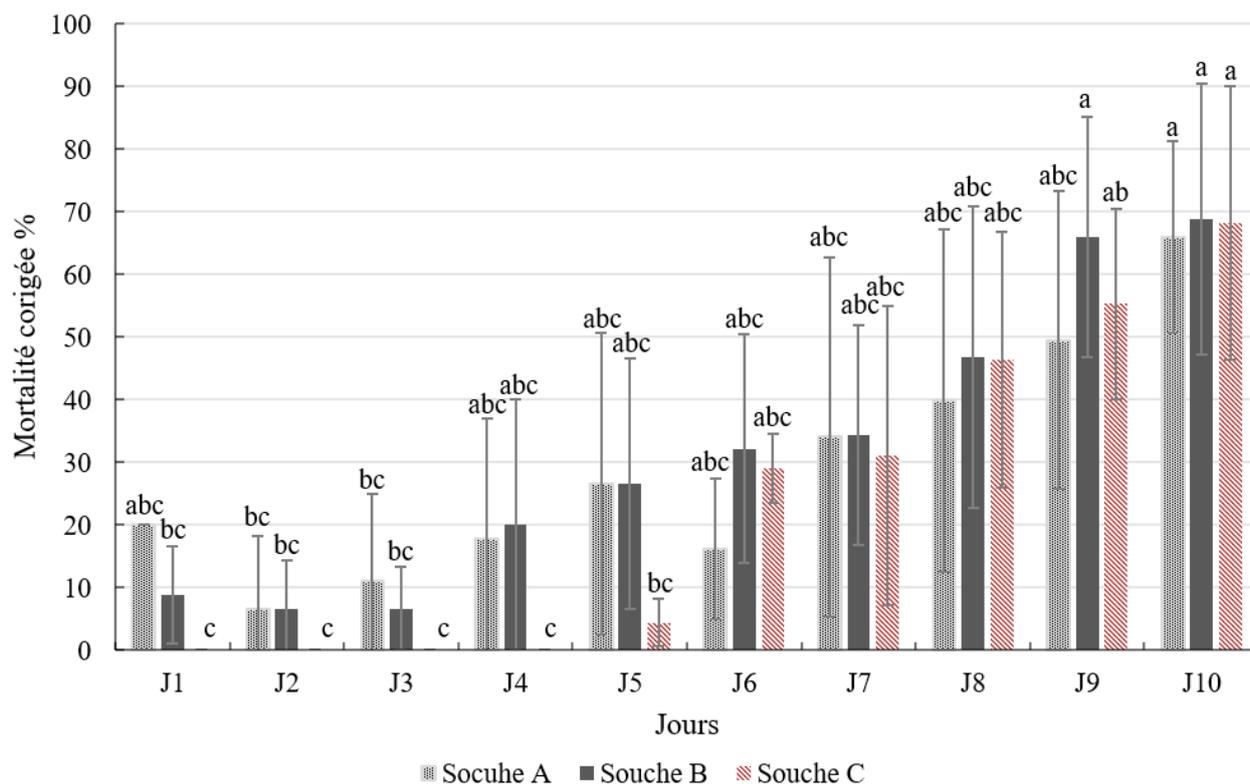


Figure 52 : Variation temporelle des mortalités moyennes de *H. pruni* sous l'effet de la concentration de 2.2×10^7 spores / ml dans la modalité de traitement par trempage.

Dans la seconde étape des essais, les trois souches ont été utilisées avec des solutions fongiques de différentes concentrations (**Tableau 04**) pendant une même période de 10 jours.

Tableau 04 : Variation des concentrations des souches fongiques étudiées utilisées contre *H. pruni*.

Souche /Concentrations (spore/ml)	C1	C2	C3
Souche A	1.8×10^7	1.8×10^6	1.8×10^5
Souche B	2.3×10^7	2.3×10^6	2.3×10^5
Souche C	3.2×10^7	3.2×10^6	3.2×10^5

L'ANOVA a mis en évidence un effet très hautement significatif des facteurs temps et concentration sur la mortalité des pucerons *H. pruni* ($P < 0,0001$, $F = 35,77$) (**Annexe 01, Tableau I**). La souche C (*Lecanicillium lecanii*) a engendré le plus fort taux de mortalité (83.03%) en comparaison avec les deux autres souches A et B à la concentration C2. En

revanche, à la concentration C1, les trois souches fongiques A, B et C ont engendré après 10 jours des taux de mortalité similaires de 65.95%, 68.88% et 68.33% respectivement (différence non significative, $P=0.587 > 5\%$, $F=0.53$) (**Annexe 01, Tableau I**).

b)- Détermination des concentrations létales CL_{50} et CL_{90}

Les résultats du tableau 05 montrent que les concentrations létales les plus faibles obtenues concernent les souches fongiques C et A. Les valeurs des CL_{50} respectives sont de 1.46×10^6 spore/ml et 1.75×10^6 spore/ml. La valeur de la CL_{90} de la souche B (*Aspergillus terreus*) (6.87×10^7 spore/ml) est par ailleurs plus faible que celle des deux autres souches fongiques A et C (**Tableau 05**).

Tableau 05 : Concentrations létales (CL_{50} et CL_{90} en spore/ml) des trois souches fongiques étudiées sur *H. pruni* dans la modalité de traitement indirect par trempage.

Souche / CL (spore/ml)	CL_{50} (spore/ml)	CL_{90} (spore/ml)
Souche A	1.75×10^6	4.11×10^8
Souche B	5.78×10^6	6.87×10^7
Souche C	1.46×10^6	1.70×10^8

c)- Détermination des temps létaux TL_{50} et TL_{90}

Les temps létaux respectifs calculés pour chacune des concentrations testées de chaque souche fongique sont présentés dans le tableau 06.

Tableau 06 : Valeurs des temps létaux TL_{50} et TL_{90} (Jours) des trois souches fongiques testées sur *H. pruni* dans la modalité de traitement indirect par trempage.

Souche fongique	C1		C2		C3	
	TL_{50}	TL_{90}	TL_{50}	TL_{90}	TL_{50}	TL_{90}
Souche A	13.68	128.42	18.83	277.50	35.37	192.31
Souche B	8.81	38.38	13.97	105.89	19.18	102.61
Souche C	10.70	27.61	7.17	16.85	31.67	148.12

D'après nos observations, les temps létaux les plus courts des mortalités de *H. pruni* ont été obtenus pour la souche C (*Lecanicillium lecanii*) avec la concentration C2. Les valeurs respectives des TL_{50} et des TL_{90} sont de 7.17 jours et 16.85 jours (**Tableau 06**).

III.1.3.2.2. Toxicité par contact sur le feuillage d'abricotier sur terrain

L'application en conditions naturelles des solutions des souches fongiques étudiées sur les feuilles d'un arbre d'abricotier infesté par *H. pruni* ne nous a pas permis d'effectuer des observations évaluables des mortalités en raison de l'absence des pucerons après 3 jours et jusqu'à 10 jours après l'application des traitements fongiques.

III.1.3.3. Effet entomopathogène sur *A. fabae*

III.1.3.3.1. Toxicité par trempage des feuilles de fève *in vitro*

Les résultats de l'effet insecticide des trois souches fongiques (A, B et C) contre le puceron *A. fabae* à la concentration initiale de 2.4×10^7 spores/ml de 24h, à 72h, sont indiqués dans le tableau 07.

L'analyse de la variance (**Annexe 01, Tableau II**) a montré un effet hautement significatif de la souche ($F = 7,82$, $P = 0,003$). La souche B affiche une moyenne de mortalité de *A.fabae* significativement plus élevée (32.01%) par rapport à celles des souches A (1.48%) et C (11.74%) qui partagent le même groupe (b) (**Tableau 07**). Cependant, les pourcentages de mortalités des pucerons n'étaient pas significativement différents selon le temps après traitement ($F = 0.15$, $P = 0,864$) (**Annexe 01, Tableau II**).

Tableau 07 : Mortalités de *A. fabae* (moyennes estimées \pm Ecart type) sous l'effet des trois souches fongiques selon la modalité de traitement par trempage.

Souches	Moyenne estimée \pm Ecart type
Souche B	32.01% \pm 7.67 a
Souche C	11.74% \pm 10.92 b
Souche A	1.48% \pm 2.56 b

Les mortalités observées de *A.fabae* restent faibles après 3 jours dans les conditions de laboratoire, donc pas d'effet évident de la concentration fongique testée. Ceci suggère l'utilisation d'une plus forte concentration fongique à une durée prolongée. Pour cette raison, les 2^e essais à de plus faibles concentrations à tester n'ont pas été effectués.

III.1.3.3.2. Toxicité par contact sur les plants de fève *in situ*

a) Effet des concentrations

L'analyse de la variance de la comparaison des moyennes de mortalités de *A. fabae* à la concentration $C1 = 3.6 \times 10^7$ spores/ml, a révélé une différence très hautement significative selon le temps ($F=10.45$, $p<0.0001$) et selon les différentes souches fongiques testées ($F=228.21$, $p<0.0001$). La **Figure 53** illustre la variation des mortalités des pucerons *A.fabae*

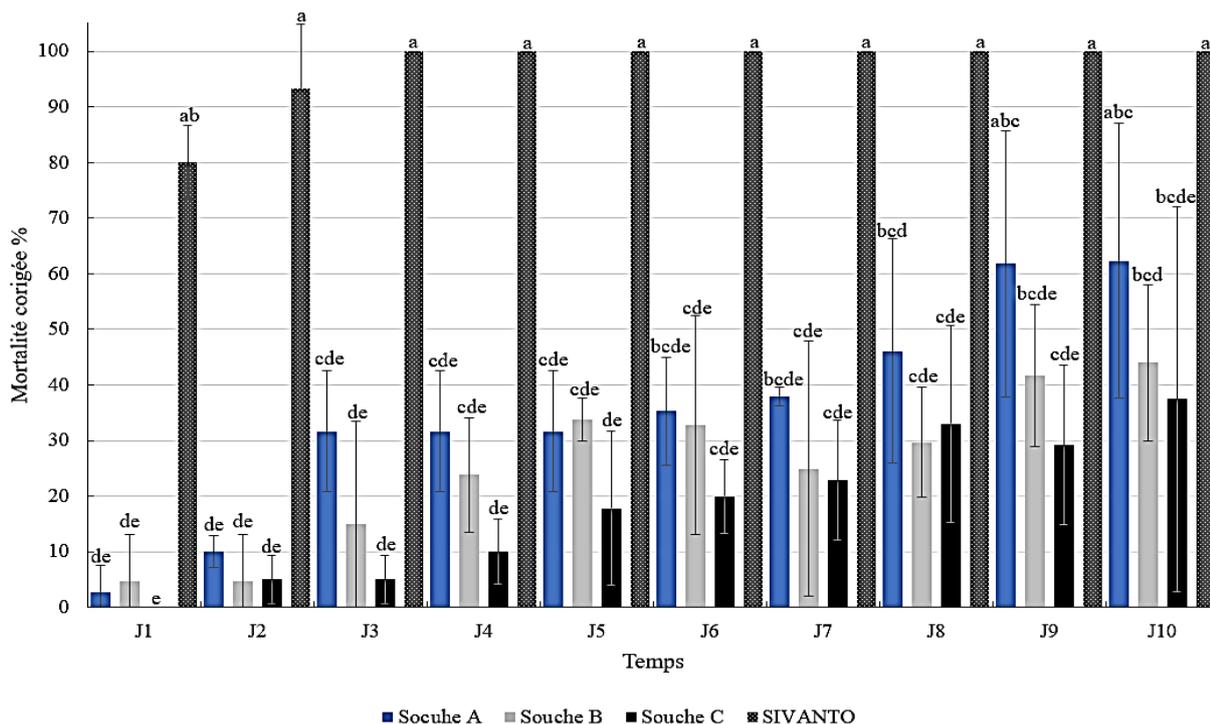


Figure 53 : Mortalités corrigées temporelles de *A. fabae* à la concentration de 3.6×10^7 spores/ml dans les conditions naturelles.

Les comparaisons multiples des moyennes de mortalité (test postHoc de Tukey) montrent les groupes homogènes suivants (**Figure 53**).

- **Les Groupe a et ab** concernent des taux de mortalité extrêmement élevées causées par le produit chimique SIVANTO, allant de 80% à 100%, entre le jour 1 et le jour 10 après l'application du pesticide.
- **Le Groupe abc** est représenté par des moyennes de mortalité corrigée de 61% sous l'effet de la souche A aux jours 9 et 10 après application.
- **Le Groupe bcd** comprend d'une part des moyennes de mortalités variant entre 41% et 46% et dues aux souches A et B, aux jours 8 et 10. Ces résultats montrent une mortalité significative mais modérée comparée aux groupes a et ab, suggérant une sensibilité moyenne au traitement fongique.

-**Le Groupe bcde** comprend d'autre part des pourcentages de mortalité corrigée entre 37% et 41% pour les souches A, B et C, du jour 7 au jour 10 après l'application du traitement fongique. La mortalité observée ici est légèrement inférieure à celle du groupe bcd.

-**Le Groupe cde** dont les moyennes estimées des taux de mortalité dues à la souche A varient entre 31% et 36% entre les jours 3 et 6. Ce groupe présente une mortalité modérée en début de période d'observation.

-**Les Groupes de** concernent des mortalités nulles à très faibles de *A. fabae*, dont les taux varient entre 4% et 15%, pour la souche A (jours 1 et 2), la souche B (jours 1 à 3), et la souche C (jours 2 à 5). **Le Groupe e** concerne un effet nul (0%) de la souche utilisée.

D'après nos résultats, la souche (A) a montré le meilleur effet entomopathogène à l'égard d'*A. fabae* en comparaison avec les deux souches fongiques testées.

Nous avons de ce fait évalué l'effet de la souche A à trois autres concentrations (C1 : 3.6×10^7 spore/ml, C2 : 3.6×10^6 spore/ml et C3 : 3.6×10^5 spore/ml) durant une même période de 10 jours.

Les résultats de l'ANOVA indiquent que les facteurs "temps" et "concentration" ont tous deux un effet très hautement significatif sur les mortalités du puceron *A. fabae*, ($F= 9,96 - p < 0.0001$, $F= 40,81 - p < 0.0001$) (**Annexe 01, Tableau III**), où la souche A a provoqué des taux de mortalité de 62.33 %, 40.86 % et 24.57 %, respectivement aux concentrations C1, C2 et C3, au bout de 10 jours après application des traitements fongiques.

b) Détermination des concentrations létales (CL_{50} et CL_{90})

Pour évaluer le potentiel insecticide de la souche A sélectionnée pour son efficacité entomopathogène plus élevée, nous avons calculé les concentrations létales (CL_{50} et CL_{90}).

La concentration de la souche A nécessaire pour atteindre une mortalité de 50% de la population des pucerons *A. fabae* est de 9.29×10^6 spores/ml alors qu'une valeur de concentration létale de 3×10^9 spore/ml est exigée pour tuer 90 % des pucerons.

c)- Détermination des temps létaux TL_{50} et TL_{90}

Le calcul des temps létaux (TL_{50} et TL_{90}) relatifs à la souche fongique A (*Penicillium* sp.) aux trois concentrations testées, met en évidence des temps de mortalité courts à la plus forte concentration C1 : 3.6×10^7 spores / ml notamment avec des valeurs de TL_{50} de 7,77 jours et des valeurs de TL_{90} de *A. fabae* de 33,38 jours (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Valeurs des temps létaux TL₅₀ et TL₉₀ (Jours) de *A. fabae* sous l'effet de la souche fongique A en conditions naturelles.

Concentration / TL (50-90)	TL 50 (jours)	TL90 (jours)
C1 (3.6×10 ⁷ spores/ml)	7.77	33.38
C2 (3.6×10 ⁶ spores/ml)	14.04	97.22
C3 (3.6×10 ⁵ spores/ml)	42.16	261.51

III.1.4. Confirmation des souches fongiques étudiées après les bioessais

Après incubation sur un milieu PDA à 25°C pendant 24h, nous avons observé les mêmes aspects macroscopiques du mycélium des souches fongiques étudiées qui s'est développé à partir des cadavres de pucerons testés (**Figure 54**). Ce résultat confirme la pathogénicité des souches fongiques à l'égard des deux espèces de pucerons cibles.

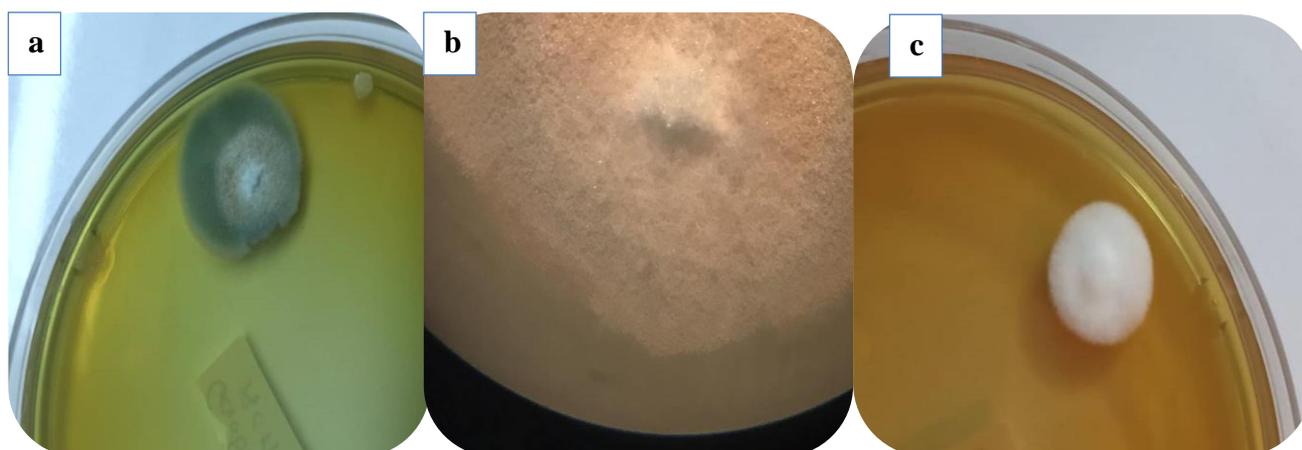


Figure 54 : Développement du mycélium fongique (Souche A - a, souche B - b; Souche C- c) sur milieu PDA, à partir des pucerons infestés morts.

III.2. Isolement, caractérisation et potentiel insecticide des isolats bactériens étudiés

III.2.1. Identification macroscopique et microscopique

Un nombre de quatre-vingts isolats a été isolé du sol des vergers de citrus investigués. Parmi ces isolats, vingt-quatre appartiennent au genre *Bacillus* (31,25%) et cinq isolats font partie du genre *Pseudomonas* (6,25%). L'observation macroscopique et microscopique des *Bacillus* et *Pseudomonas* a montré une variété de colonies et cellules bactériennes selon les traits caractéristiques de chaque genre.

Les colonies du genre *Bacillus* sont de taille comprise entre 2 et 4 mm, de couleur beige crème avec un contour irrégulier (**Figure 55.a**) [183]. Les cellules sont sous forme de bâtonnets de 5µm de long (**Figure 55.b**) [185]. Les colonies appartenant au genre *Pseudomonas* sont rondes, opaques et se caractérisent par un contour régulier, avec présence d'un pigment fluorescent (**Figure 55.c**) [184]. Elles apparaissent sous forme de bacilles droits et fins de 0,5 à 1,3µm de long (**Figure 55.d**) [186].

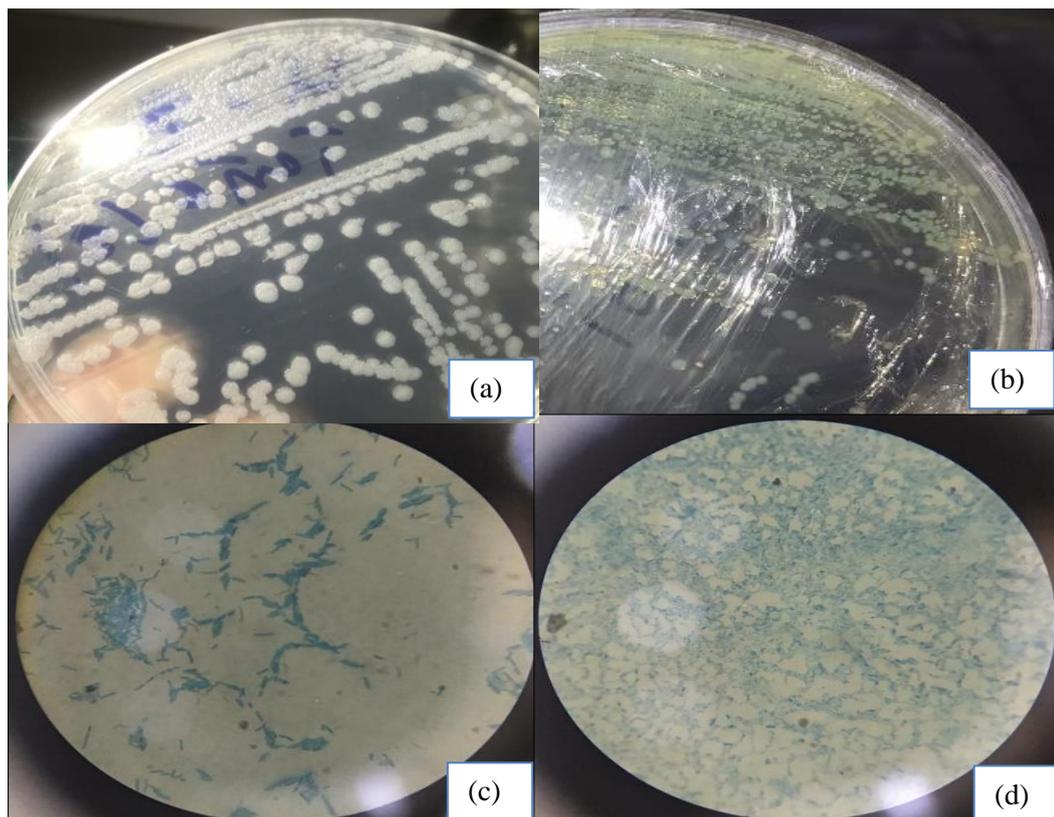


Figure 55 : Caractères macroscopique et microscopique des genres *Bacillus* et *Pseudomonas*.

III.2.2. Résultats des tests d'orientation

Les isolats bactériens appartenant au genre *Bacillus* possèdent les caractères biochimiques suivants : (Gram +, Oxydase +/-, Catalase +, Citrate +, Glucose +, saccharose - ,

lactose -, H₂S -, Gaz -) d'après **Gonzalez et al** [187]. Tandis que les isolats bactériens du genre *Pseudomonas* sont Gram -, Oxydase +, Catalase +, Citrate +, Glucose +, saccharose -, lactose -, H₂S - ; Gaz - selon **Suman et al** [188]. Les résultats des tests d'orientation des isolats des deux genres étudiés sont présentés dans le **Tableau XII, Annexe 03**.

III.2.3. Caractérisation moléculaire

Deux genres bactériens (*Bacillus* et *Pseudomonas*) ont été choisis pour l'étude du potentiel insecticide des bactéries sur les espèces aphidiennes cibles. Ces genres contiennent la majorité des bactéries entomopathogènes. Les isolats utilisés B4, B13, B22, B23, B24, P2 et P4 ont pour numéro d'accension GenBank des séquences du gène de l'ARNr 16S respectivement OR915493, OR915490, OR915491, OR915495, OR915489, OR915494 et OR915492.

L'analyse BLAST des isolats, B1, B2, B3, B4 et B5, a indiqué qu'elles appartenaient au genre *Bacillus* (famille des Bacillaceae). Les séquences de toutes ces souches étaient très similaires (100 %) à celles de *Bacillus thuringiensis* et de *Bacillus cereus* (**Tableau 10**) (**Figure 58**). De plus, chaque souche a montré une séquence de 100% de similarité avec d'autres espèces. Ainsi, l'isolat B23 a montré 100% de similarité dans sa séquence avec *Bacillus proteolyticus*, B24 et B13 avec *Bacillus wiedmannii* et B22 avec la souche *Bacillus anthracis*. Cependant, la souche B6 présente une identité de séquence significative (100 %), les souches types n'étant étroitement liées qu'à *Lysinibacillus fusiformis* et *Lysinibacillus sphaericus*. Dans d'autres cas, P2 présente une similitude totale (100 %) avec *Pseudomonas sp.* Cependant, l'isolat P4 appartient à un autre genre, *Enterococcus*, avec une grande similitude de séquence (100%) avec la souche *Enterococcus gallinarum*, la souche GI13 (MT158590.1) et *Enterococcus sp* (**Tableau 09**) (**Figure 58**).

Tableau 09 : Proposition d'identification des isolats bactériens, sur la base de l'analyse BLAST de leurs séquences du gène de l'ARNr 16S.

<i>Isolate</i>	<i>GenBank identification suggestion</i>	<i>Similarity (%)</i>	<i>GenBank accession numbers</i>
B23	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>tenebrionis</i> strain NB176-1	100%	CP114399.1
	<i>Bacillus cereus</i> strain LAM 30	100%	EU019990.1
	<i>Bacillus proteolyticus</i> strain MRC_ZO3_41	100%	OK605866.1
B24	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain HER1410	100%	CP050183.1
	<i>Bacillus cereus</i> strain HZ-01	100%	MT328556.1

	<i>Bacillus wiedmannii</i> G071	100%	LC515603.1
B13	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain NBAIR_Bt104	100%	OQ600809.1
	<i>Bacillus wiedmannii</i> strain SN2-2	100%	MT071682.1
	<i>Bacillus cereus</i> strain ER5	100%	MT124530.1
B22	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain FDAARGOS 791	100%	CP054568.1
	<i>Bacillus anthracis</i> strain FDAARGOS 695	100%	CP054816.1
	<i>Bacillus cereus</i> strain 65gite	100%	MT378165.1
P4	<i>Enterococcus gallinarum</i> strain GI13	100%	MT158590.1
	<i>Enterococcus</i> sp. CSQRZN3.4.9	100%	LC484830.1
B4	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain Uyi_38	100%	MT507231.1
	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain TB-22	100%	KC540952.1
P2	<i>Pseudomonas</i> sp. strain BIS1097	100%	MN810183.1
	<i>Pseudomonas</i> sp. strain P111-L04pd	100%	MN043751.1

D'après l'analyse moléculaire sur la base des séquences du gène de l'ARN 16s, les isolats bactériens ont été identifiés comme suit : *Bacillus thuringiensis* (B13, B22, B23, B24), *Enterococcus gallinarum* (P4), *Lysinibacillus fusiformis* (B4) et *Pseudomonas* sp (P2) (**Tableau 10, Figure 56**). La position phylogénétique des isolats bactériens (B23, B24, B13, B22, P4, B4 et P2) avec des espèces étroitement apparentées sur la base du séquençage du gène de l'ARNr 16S est indiquée dans l'arbre phylogénétique créé à l'aide de la méthode de neighbor-joining (**Figure 56**).

Tableau 10 : 'Accession number' des isolats bactériens testés (base de données GenBank)

Isolats	Souches	Accession number
B4	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	OR915493
B13	<i>Bacillus thuringiensis</i>	OR915490
B22	<i>Bacillus thuringiensis</i>	OR915491
B23	<i>Bacillus thuringiensis</i>	OR915495
B24	<i>Bacillus thuringiensis</i>	OR915489
P2	<i>Pseudomonas</i> sp	OR915494
P4	<i>Enterococcus gallinarum</i>	OR915492

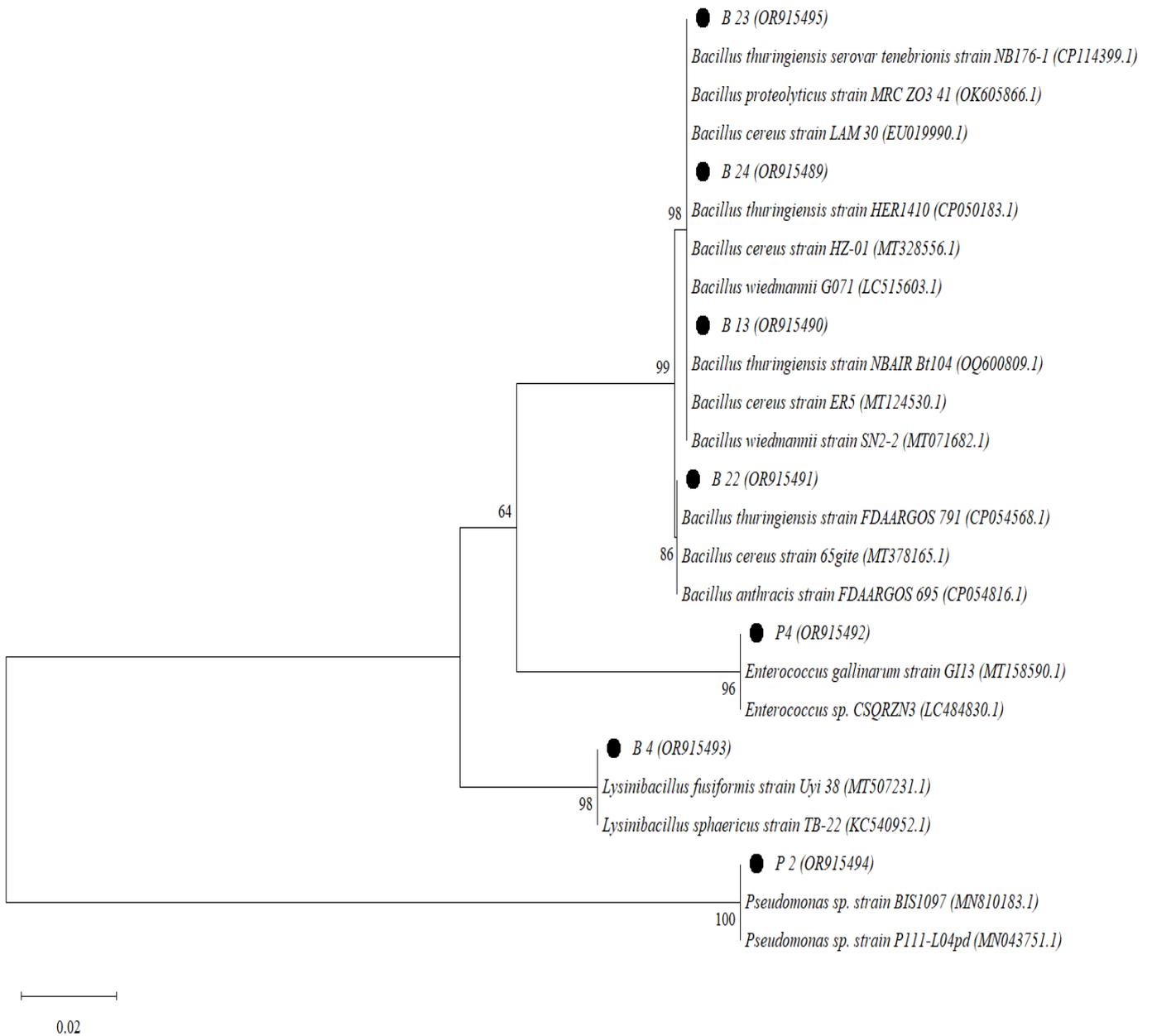


Figure 56 : Arbre phylogénétique des souches bactériennes testées utilisant la méthode de neighbor-joining basée sur l'analyse des séquences de leur gène ARNr 16S.

III.2.4. Evaluation du potentiel insecticide des isolats bactériens étudiés

III.2.4.1. Symptômes observés sur les pucerons infestés

Le traitement à base des isolats bactériens étudiés a eu pour effet de dessécher les individus, les laissant immobile avant de succomber. On a souvent remarqué que la manifestation de la mort se traduit par un corps qui vire au noir profond et par une position sur le dos (**Figure 57**). **Rodríguez *et al.***, [189] a également constaté des symptômes similaires lorsqu'ils les pucerons ont été traité avec *Bacillus* sp.

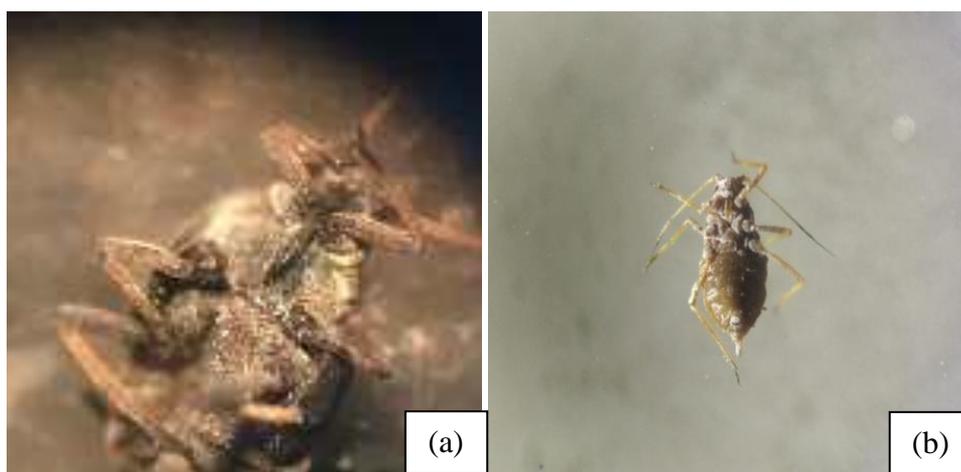


Figure 57 : Effet des souches bactériennes étudiées sur *Aphis fabae* (a) et *Hyalopterus pruni* (b).

III.2.4.2. Effet entomopathogène sur *H. pruni*

III.2.4.2.1. Sélection globale des isolats efficaces après 72heures

Nous avons procédé aux essais biologiques des suspensions bactériennes des isolats de *Bacillus* (B) et de *Pseudomonas* (P) en comparaison avec les témoins *Bacillus* sp (*Bt*, référence HF911367) et *Pseudomonas* sp (*Pf* référence HF911366 (**Figure 58**) à l'égard de *H. pruni*. A 72h, les taux de mortalité corrigés des pucerons ont montré une différence hautement significative entre les isolas bactériens ($df = 30$, $Fr = 3,5$, $p < 0,0001$) sous l'effet de la concentration 1×10^8 UFC/ml.

L'isolat P4 et la souche de référence *Bt* ont produit des niveaux de mortalité très élevés (95.83% et 93.81% respectivement) significativement différents de ceux des souches B24, B17, B23, B14, P2 et B22 (24% du total) qui par contre ont produit des effets moins élevés sur la mortalité de *H. pruni* avec des variations allant de 71.42% à 85.71%.

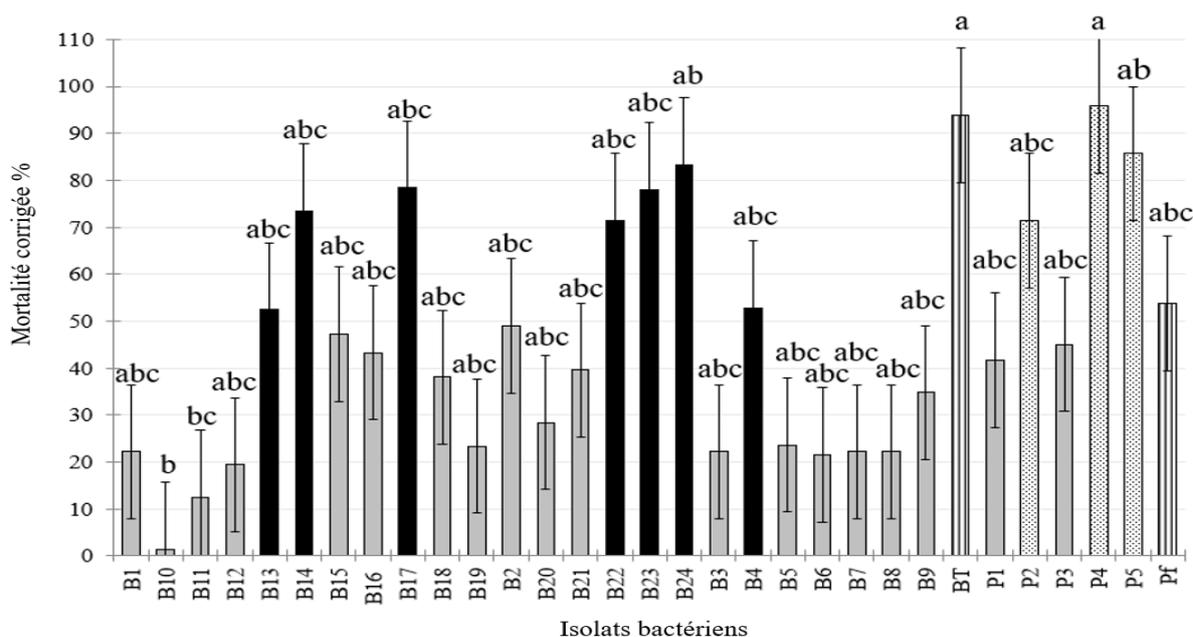


Figure 58 : Effet de tous les isolats bactériens contre *Hyalopterus pruni*, à 72 heures après l'application du traitement à une concentration de 1×10^8 UFC/ml.

La souche de référence *Pseudomonas* Pf et les isolats B4, B13, B2, B15, P3, B16, P1, et B21 (31% du total), ont provoqué des mortalités des pucerons allant de 40% à 53%. Néanmoins, les souches B18, B9, B20, B5, B19, B7, B8, B1, B3, B6, B12, et B11 (41.3% du total) ont induit des pourcentages de mortalité beaucoup plus faibles variant de 12 à 34% (Figure 58). Mais, l'isolat B10 n'a pas affecté la mortalité des pucerons.

III.2.4.2.2. Toxicité des isolats les plus efficaces sélectionnés, à 24h, 48h et 72h.

Globalement, l'augmentation des pourcentages de mortalité des pucerons *H. pruni* dépendait du temps (df = 2,000, Fr = 189,669, $p < 0,0001$). Le meilleur taux de mortalité (56.24%) a été enregistré après 72 h, suivi par ceux enregistrés à 48 h (34.31%), puis à 24 h (9.62% de mortalité seulement) (Tableau 11).

Tableau 11 : Mortalité moyenne (%) des pucerons *H. pruni* sous l'effet des isolats sélectionnés après 24, 48 et 72 heures

Temps	Mortalité des pucerons <i>H. pruni</i>
	(Moyennes \pm Erreur standard)
72h	56.24 % \pm 1.638 a
48h	34.31 % \pm 1.65 b
24h	9.92 \pm 1.74 c

- *Effet de différentes concentrations des isolats sélectionnés après 72 heures*

Les isolats P4, P5, B24, B17, B23, B14, P2, B22, B4 et B13 (**Figure 59**) qui ont provoqué des taux de mortalité des pucerons *H. pruni* supérieurs à 50%, ont été testés aux concentrations (C1=1×10⁸ UFC/ml, C2=1×10⁷ UFC/ml, C3=1×10⁶ UFC/ml, C4=1×10⁵ UFC/ml), pour une durée de 72 heures. L'évaluation de la pathogénicité de ces isolats à ces concentrations a montré des taux de mortalité variables sur *H. pruni* (**Figure 59**), (df = 33, Fr = 2,368, p = 0.001).

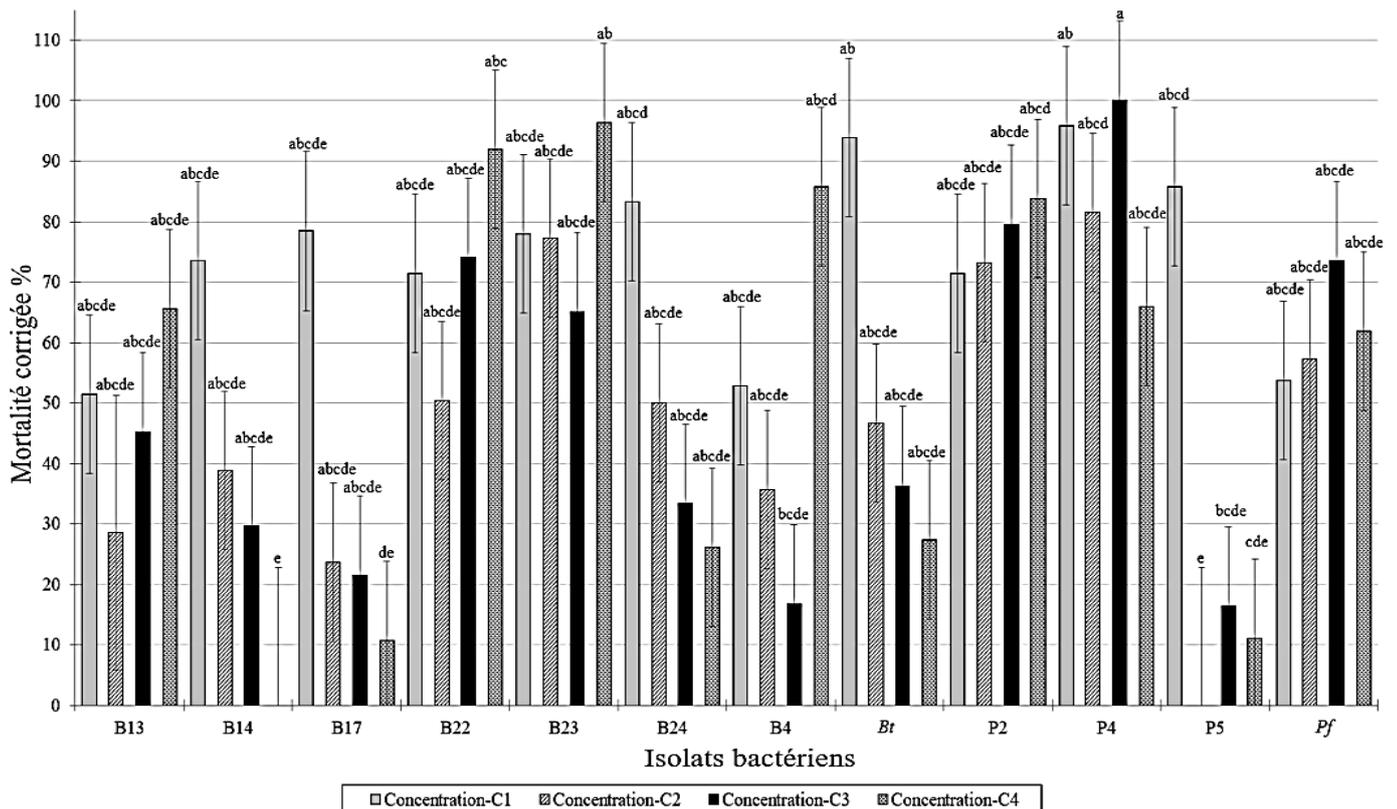


Figure 59 : Effet des isolats bactériens sélectionnés aux différentes concentrations testées contre *H. pruni* 72 heures après application des traitements.

Tous les isolats testés ont donné des mortalités effectives comprises entre 51.37 % et 95% à la dose la plus élevée (C1) (**Figure 59**). A la concentration la plus faible (C4), les souches bactériennes B23, B22, B4 (*Bacillus thuringiensis*) et P2 (*Pseudomonas* sp.) ont induit des mortalités élevées chez les pucerons *H. pruni*, respectivement de 96%, 91%, 85% et 83%, (**Figure 59**). De plus, ces taux de mortalité étaient plus élevés que ceux enregistrés avec les souches bactériennes P4 (65.92%) et B13 (65.61%).

Aux concentrations C2 et C3, l'isolat P4 (*Enterococcus gallinarum*) a également provoqué une mortalité très importante des pucerons *H. pruni*, allant de 80 % à 100 %. Des taux de mortalité assez similaires (79 % et 73 %) ont été enregistrés à ces mêmes concentrations avec l'isolat P2. Bien que moins efficaces que les isolats P2 et P4, les isolats B23 et B22 ont induit

des taux de mortalité élevés aux concentrations C3 (74% - B22, 65% - B23) et C2 (77.42% - B23, 50.31% - B22), 50% pour B24. En revanche, l'isolat B4 a enregistré une forte mortalité à la concentration C4 tout en montrant une faible mortalité aux autres concentrations (C2 et C3).

En comparaison avec les deux souches de référence, *Bt* et *Pf*, d'une part, le taux de mortalité a connu une baisse significative en corrélation avec la diminution des concentrations préparées par *Bt*, où 45% (C2), 36% (C3), et 24% (C4) ont été enregistrés. D'autre part, la souche *Pf* a donné des taux de mortalité de plus de 60 % lors de traitements avec de faibles concentrations de C3 (73.61 %) C4 (61.80 %), et C2 (55.32 %).

III.2.4.2.3. Détermination des concentrations (CL₅₀ et CL₉₀) et des temps létaux (TL₅₀ et TL₉₀)

Les CL₅₀ et CL₉₀ des souches bactériennes potentiellement entomopathogènes (B22, B23, P2 et P4) ont été calculées et comparées à celles des souches de référence *Bt* et *Pf*, après 72h du traitement (**Tableau 12**).

Tableau 12 : Valeurs de concentrations létales CL₅₀ et CL₉₀ (UFC/ml) pour les souches B22, B23, P2, P4 en comparaison aux souches de référence *Bt* (*HF911367*) *Pf* (*HF911366*).

Isolats bactériens	CL ₅₀ (CFU/ml)	CL ₉₀ (CFU/ml)
B22	3.30×10 ⁰⁸	3.50×10 ⁴
B23	1.05×10 ¹⁰	1.21×10 ⁵
P2	2.10×10 ¹¹	1.16×10³
P4	1.08 ×10²	1.27×10 ⁵
<i>Bt</i>	2.07×10 ⁶	1.62×10 ⁸
<i>Pf</i>	2.09×10 ⁹	3.78×10³

La CL₅₀ de la souche P4 (*Enterococcus gallinarum*) était la plus faible avec une valeur de 1.08×10² UFC/ml par rapport à celles des autres souches potentiellement insecticides, ainsi qu'à celles des contrôles positif *Bt* et *Pf* (tableau 13). Contrairement, la CL₉₀ de la souche P2 (*Pseudomonas* sp.) et celle de la souche de référence *Pf* étaient faibles avec des valeurs respectives de 1.16×10³ UFC/ml et 3.78×10³ UFC/ml en comparaison avec celle du reste des souches bactériennes isolées et potentiellement efficaces, (**Tableau 12**).

Nous avons calculé les temps létaux qui nécessitent de tuer 50 % et 90 % de la population de *H. pruni* sous l'effet des isolats bactériens B22, B23, P2 et P4 sélectionnés pour leur importante efficacité sur les mortalités aux différentes concentrations testées. Ces temps létaux (50 et 90) ont été comparés à ceux des souches de référence *Bt* et *Pf*.

Les résultats des TL₅₀ relatifs à la souche P2 (*Pseudomonas* sp.), mettent en évidence de durées plus courtes de 1.4 jours après le traitement par la concentration (C4). Par ailleurs, la TL₉₀ de la souche P4 (*Enterococcus gallinarum*) se démarque par un temps plus court équivalent à 2.1 jours après le traitement par la dose C3 (**Tableau 13**).

Tableau 13 : Valeurs des temps létaux TL₅₀ et TL₉₀ (Heures) pour les souches B22, B23, P2, P4 en comparaison aux souches de référence *Bt* (HF911367) et *Pf* (HF911366).

souches bactériens	C1		C2		C3		C4	
	TL ₅₀ /jours	TL ₉₀ / jours	TL ₅₀ / jours	TL ₉₀ / jours	TL ₅₀ / jours	TL ₉₀ / jours	TL ₅₀ / jours	TL ₉₀ / jours
B22	2.3	5.6	2.9	9.8	2.5	4.4	2	3.5
B23	2	4.2	1.8	3.7	2.1	6.4	1.5	2.4
P2	2.3	4.1	1.9	3.8	1.8	4	1.4	3.2
P4	1.7	2.5	1.9	3.8	1.5	2.1	2	4
<i>Bt</i>	1.7	3.6	5.2	92.3	12.2	701.9	8.3	87.6
<i>Pf</i>	2.9	10.4	2.3	5.6	2.4	3.8	2.7	5.6

III.2.4.3. Effet entomopathogène sur *A. fabae*

III.2.4.3.1. Toxicité temporel global

Les 5 isolats bactériens ayant manifesté des taux de mortalité importants aux concentrations, (C1=1×10⁸ UFC/ml, C2=1×10⁷ UFC/ml, C3=1×10⁶ UFC/ml, C4=1×10⁵ UFC/ml), contre le puceron farineux du prunier *Hyalopterus pruni*, ont été testés avec les mêmes concentrations sur le puceron *Aphis fabae*. dans le but d'évaluer leur pouvoir insecticide sur cette espèce.

L'analyse de la variance a montré une différence très hautement significative temps dépendant (F=140,23, p = 0.000 <1/‰),). On observe une moyenne des mortalités significativement plus élevée (51,92%), à 72 h après traitement, sous l'effet de tous les isolats bactériens testés aux 4 concentrations testées. Les mortalités enregistrées des pucerons *A. fabae* ont été nettement plus faibles à 48 h (26.56%) et à 24 h (9.97%), (**Tableau 14**). Nos observations indiquent démontre que le temps a une fonction significative dans l'apparition de l'effet entomopathogène des isolats bactériens testés et la mortalité cumulée à 72 h est la base d'évaluer leurs potentiels insecticides.

Tableau 14 : Mortalités moyennes (%) des pucerons *A. fabae* sous l'effet des isolats bactériens sélectionnés 24, 48 et 72 heures après traitement.

Temps	Moyennes ± Erreur standard
72h	51,92% ± 18,80 a
48h	26,56% ± 13,59 b
24h	9,97%± 9,57 c

III.2.4.3.2. Effet isolat à 72h

La figure 64 montre la variation des taux de mortalité des pucerons *A. fabae* le 3^e jour après application du traitement bactérien à base des isolats sélectionnés (B22, B23, B24, P2, P4) et des isolats de référence (Bt et Pf) aux différentes concentrations testées. Pour chacun de ces isolats, on remarque un effet significativement très variable des concentrations (Figure 64). Les résultats de la variance indiquent un effet pathogène très hautement significatif selon la concentration des cinq isolats bactériens contre *A. fabae*, 72 h après application ($F=4,63$, $p = 0.000$ ($p < 0.0001$)).

Plus particulièrement, à 72 heures, on remarque un effet entomopathogène des isolats B24 (*Bacillus thuringiensis*), et B22 (*Bacillus thuringiensis*) avec un taux allant de 83% à 85% respectivement aux concentrations C3 (1×10^6 UFC/ml) et C2 (1×10^7 UFC/ml) et avoisinant l'effet entomopathogène de la souche de référence Bt. Cependant, l'isolat P4 (*Enterococcus gallinarum*) qui a également engendré une mortalité des pucerons similaire à celle de l'isolat B22, est manifestement plus efficace que la souche de référence Pf aux 4 concentrations testées (Figure 60).

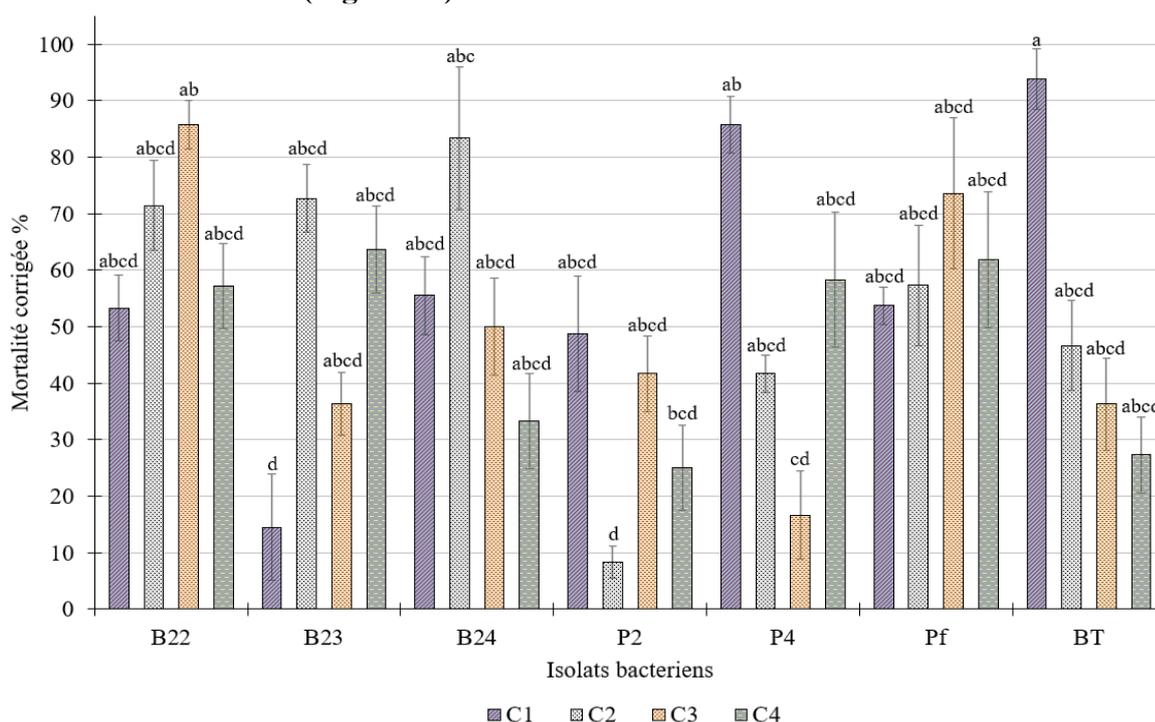


Figure 60 : Effet des isolats bactériens sélectionnés aux différentes concentrations 72 heures après application contre *Aphis fabae*.

L'isolat B22 (*Bacillus thuringiensis*) a engendré le taux de mortalité le plus élevé de 85.71% à la concentration C3 (1×10^6 UFC/ml) suivi par l'isolat P4 avec une mortalité de 85.71% à la concentration C1. L'isolat B24 (*Bacillus thuringiensis*) a manifesté un taux aussi important de 83.33% à la concentration C2 comme les isolats B23 (*Bacillus thuringiensis*) et B22 (*Bacillus thuringiensis*) qui ont aussi causé des mortalités de l'ordre de 72.72% et 71.14% respectivement. Par rapport, Un effet entomopathogène important (63.63% de mortalité) a été noté avec la plus faible concentration C4 (1×10^5 UFC/ml) pour l'isolat B23, comme pour l'isolat P4 (58.33 %) et B22 (57.14 %).

Donc, les isolats B22, B23, B24 et P4 ont engendré des mortalités importantes et supérieures à 57 % aux concentrations respectives testées (C1= 1×10^8 UFC/ml, C2= 1×10^7 UFC/ml, C3= 1×10^6 UFC/ml et C4= 1×10^5 UFC/ml) Un taux de 48,08% seulement de mortalité a été observé avec l'isolat P2 à la concentration élevé C1. Les autres concentrations du même isolat n'ont pas eu une efficacité notable sur les pucerons *A. fabae* : 8,33 % (C2), 42.66 % (C3) et 25 %

En comparaison, la souche de référence Bt a provoqué de faibles mortalités aphidiennes à des taux de 46.66%, 36.29% et 27.30 % respectivement aux concentrations C2, C3 et C4. En revanche, les traitements à base de la souche de référence Pf aux faibles concentrations C3 et C4 ont entraîné des taux de mortalité supérieurs à 60% : (73.61% et 61.80% respectivement) **(Figure 64).**

III.2.4.3.3. Détermination des concentrations (CL₅₀ et CL₉₀) et des temps létaux (TL₅₀ et TL₉₀)

Les CL₅₀ et CL₉₀ des souches bactériennes potentiellement entomopathogènes (B22, B23, B24, P2 et P4) ont été calculées et comparées à celles des souches de référence *Bt* et *Pf*, après 72h du traitement (Tableau 16).

Tableau 15 : Valeurs de concentrations létales CL₅₀ et CL₉₀ (UFC/ml) pour les souches B22, B23, B24, P4 en comparaison aux souches de référence BT (*HF911367*) PF (*HF911366*).

	B22	B23	B24	P4	<i>Bt</i>	<i>Pf</i>
CL ₅₀	1.56×10^{12}	1.41×10^6	7.92×10^5	2.54×10^6	1.80×10^6	3.79×10^9
CL ₉₀	5.90×10^4	2.13×10^2	5.13×10^{10}	$1,51 \times 10^{10}$	1.61×10^8	1.27×10^4

La CL₅₀ de l'isolat B24 (*Bacillus thuringiensis*) était la plus faible parmi les isolats les plus potentiellement efficaces, avec une valeur de 7.92×10^5 UFC/ml, ainsi que par rapport aux contrôles positifs *Bt* (1.80×10^6 UFC/ml) et *Pf* (3.79×10^9 UFC/ml) (Tableau 16). L'isolat B23 (*Bacillus thuringiensis*) a eu la concentration létale 90 % (CL₉₀) la plus faible de 2.13×10^2

UFC/ml, même en comparaison avec celles des souches de référence *Pf* (1.27×10^4 UFC/ml) et *Bt* (1.61×10^8 UFC/ml). (**Tableau 15**).

Nous avons calculé les temps létaux qui nécessitent de tuer 50 % et 90 % de la population de *A. fabae* sous l'effet de quatre isolats bactériens B22, B23, B24 et P4 sélectionnés pour leur efficacité potentielle à différentes concentrations (**Tableau 16**).

Tableau 16 : Valeurs des temps létaux TL₅₀ et TL₉₀ (Jours) pour les souches B22, B23, B24, P4 en comparaison aux souches de référence *Bt* (HF911367) *Pf* (HF911366).

Isolats bacteriens	C1		C2		C3		C4	
	TL ₅₀ / jours	TL ₉₀ / jours						
B22	3.08	12.69	2.29	5.62	2.00	4.54	2.74	4.75
B23	9.52	46.10	2.58	4.21	5.55	36.12	2.75	4.68
B24	2.71	6.38	1.15	4.67	2.77	13.79	4.09	14.63
P4	1.80	5.20	3.02	5.68	4.90	12.41	2.59	4.42
<i>BT</i>	2.03	3.04	2.96	5.90	4.38	17.98	6.25	25.15
<i>PF</i>	2.97	11.19	2.35	5.63	2.39	3.84	2.68	5.58

La plus courte durée du temps létaux 50 % (TL₅₀) concerne l'isolat B24 (*Bacillus thuringiensis*) avec 1.15 jours, tandis que le temps létaux 90% TL₉₀ le plus court a été de 4.21 jours manifesté par l'isolat B23 (*Bacillus thuringiensis*) contre les pucerons *A.fabae* traités par la concentration C2. En comparaison avec les souches témoins, un TL₉₀ du *Bt* a été de 3.04 jours avec la concentration C1 (**Tableau 16**)

Chapitre IV : Discussion

IV. Discussion

IV.1. Potentiel entomopathogène des isolats fongiques testés

Les résultats auxquels nous avons abouti ont démontré un meilleur pouvoir insecticide des trois isolats fongiques sélectionnés parmi onze isolats contre les deux espèces d'aphides. Boni et *al.*, [37] ont en effet sélectionné 5 isolats fongiques à partir de 19 isolats, d'après leur effet insecticide le plus performant. L'identification moléculaire des souches sélectionnées a pris en compte le séquençage des gènes des régions ITS et EF-1 α de l'ADN ribosomal [190], qui permettent d'examiner les liens évolutifs entre divers taxons fongiques entomopathogènes par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) [191]. Selon Raja et *al.*, [192], la région génique ITS est la plus utile (code-barres universel) pour l'identification des champignons au niveau des espèces, étant donné que l'ITS fournit les plus grandes probabilités pour un groupe varié de champignons [193].

Trois espèces fongiques ont été identifiées : *Penicillium* sp. (A_ITS), *Aspergillus terreus* (B_ITS) et *Akanthomyces lecanii* (C_ITS). D'après Altinok et *al.*, [85], l'ingestion des champignons par les insectes à travers le trempage de feuilles infestées dans une solution fongique, cause une infection mortelle par voie intestinale pouvant atteindre 100 % de mortalité.

Différents travaux ont déjà prouvé le pouvoir entomopathogène des trois espèces fongiques identifiées [194,195,196], ce qui corrobore les résultats obtenus. La souche C_ITS *Akanthomyces (Lecanicillium) lecanii* [158], a causé *in vitro* des mortalités importantes du puceron farineux du prunier (*H. pruni*) aux différentes concentrations testées. La valeur de la CL₅₀ (1.46×10^6 spore/ml) était la plus faible par rapport à celles de *Penicillium* sp et *Aspergillus terreus*. Cependant, cette souche n'a pas montré une efficacité contre *A. fabae* dans les mêmes conditions *in vitro*. D'après Diaz et *al.*, [197], la souche (ICAL6) de *Akanthomyces lecanii* était efficace à une concentration létale CL₅₀ de 1.05×10^7 spore.ml⁻¹ contre trois espèces aphidiennes, dont le puceron vert du pêcher *Myzus persicae*.

Cette espèce fongique a été utilisée pour contrôler différentes espèces de pucerons d'importance économique sur les céréales et le cotonnier tels *Schizaphis graminum* [198], *Sitobion avenae*, le puceron vecteur de la jaunisse nanisante de l'orge *Rhopalosiphum padi* [199], ainsi que le puceron du cotonnier *Aphis gossypii*, espèce très polyphage sur plus de sept cents plantes, [200]. Dans cette étude, nous confirmons l'efficacité insecticide de *A. lecanii* sur *H. pruni*.

D'autres catégories de ravageurs peuvent être également contrôlés par ce champignon comme c'est le cas de l'acarien rouge des agrumes *Panonychus citri* [201] et *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) [202], l'aleurode du tabac *Bemisia tabaci* [203] ainsi que l'aleurode des serres *Trialeurodes vaporariorum* [204].

La différence de l'efficacité d'*Akanthomyces lecanii* sur les deux espèces aphidiennes ciblées, peut s'expliquer par la spécificité du champignon entomopathogène pour l'insecte cible pour le. Mohammed et *al.*, [205] ont trouvé en effet une différence de mortalité entre quatre espèces de pucerons traités avec la même souche de *A. lecanii*, où le taux de mortalité sur le puceron vert de pêcher *Muzus persicae* était plus important que celui constaté sur *A. fabae* dans les mêmes conditions de laboratoire.

Lorsque les conidies de *A. lecanii* s'installent sur la cuticule de l'hôte, elles adhèrent à l'épicuticule et germent. Les conidies germées forment des tubes germinatifs qui pénètrent directement la cuticule ou se développent à la surface de l'épicuticule. Le tube germinatif pénètre en lysant à la fois l'épicuticule et la procuticule [206]. Cette action est accomplie sous l'effet d'une pression mécanique exercée par l'appresorium (cheville de pénétration) et la sécrétion d'enzymes (protéases, chitinases et estérases), ainsi que la production de mycotoxines, pour pénétrer dans la cuticule de l'insecte et pour la décomposer.

Les mycotoxines produites par *A. lecanii* sont le bassianolide [207], la vertilecanine-A₁, l'acide décénédioïque et l'acide 10-hydroxy-8-décénoïque [208]. Lorsque les nutriments de l'hôte sont épuisés, les blastopores se différencient en hyphes allongés qui s'étendent vers l'extérieur du corps en formant un tapis mycélien de conidiophores sur la surface du tégument, ce qui entraîne une momification. Dans des conditions environnementales favorables, les conidiophores arrivent à maturité et donnent naissance à des conidies qui poursuivent le cycle de la maladie.

Les résultats des bio essais *in vivo* contre *A. fabae* ont révélé une efficacité de la souche A ITS (*Penicillium* sp.) à la concentration 3.6×10^7 spores/ml, se traduisant par un taux de mortalité de 62.33 % après 10 jours d'application. Des études antérieures ont montré que les conidies de cette espèce étaient hautement pathogènes pour les pucerons. L'espèce *Penicillium verrucosum* a été utilisée pour le contrôle du puceron polyphage *Aphis gossypii* sur la Papaye (*Carica papaya* Linn.) donnant un taux de mortalité de 90 % à la concentration 1×10^7 spore/ml, 92 h après l'application [209]. Par contre *Penicillium* n'était pas potentiellement toxique pour contrôler le puceron du chou *Brevicoryne brassicae* [210] ainsi

que le puceron vert du pêcher *Myzus Persicae* [211]. Ceci peut-être dû aux conditions environnementales et culturales qui peuvent influencer la sporulation ou la spécificité du champignon à l'hôte [212]. La souche *Penicillium* sp. était par contre efficace contre l'insecte ravageur *Tribolium castaneum* (Coleoptera : Tenebrionidae) engendrant une mortalité totale de l'insecte, 7 jours après traitement, [194].

La mortalité des pucerons traités par la souche A_ITS (*Penicillium* sp.), pourrait s'expliquer par un meilleur développement du mycélium dû à l'augmentation du nombre de spores fongiques dans les conditions favorables de notre expérimentation (sous serre pour *A. fabae* et *in vitro* pour *H. pruni*). Long et al., [213] a mentionné que la mort de l'insecte est due au fait que les champignons pourraient infecter l'insecte ou que les spores entrent en contact avec l'insecte puis elles se développent et se répandent dans l'organisme de l'insecte pour obtenir des nutriments. Cette action entraîne la mort de l'hôte par inanition physiologique 3 à 7 jours après l'infection [214]. Outre à cela, la sécrétion d'enzymes dégradant la cuticule, telles que les chitinases, les lipases, les Nacétylglucosaminidases et les estérases, permet à *Penicillium* de pénétrer plus facilement via la cuticule de l'insecte, [215].

Dans notre étude, la souche B_ITS (*Aspergillus terreus*) n'a pas été potentiellement toxique sous serre contre *A. fabae* puisqu'un plus faible taux de mortalité a été obtenu : 43,9 % à la concentration de 3.6×10^7 spores /ml après 10 jours d'application. Les résultats de Abdel-Galil et al., [216] ont également montré un faible taux de seulement 30 % de mortalité dû à la souche *Aspergillus terreus* contre le même puceron (*A. fabae*) après 72 heures d'application à la concentration de 11×10^6 spore/ml. Aussi, cette même souche fongique était également moins efficace sur *H. pruni* avec une valeur plus élevée de la CL₅₀.

Cependant, certains autres travaux ont expliqué que l'espèce *Aspergillus terreus* est beaucoup plus utilisé contre différentes espèces de moustiques vecteurs de pathologies humaine et animale, parmi lesquelles *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*, et *Aedes aegypti* [217]. Khalid et al., [218] ont obtenu des taux de mortalité respective de 90 %, 65 % et 50 % sous l'effet de cette souche respectivement aux concentrations de 10^7 , 10^6 et 10^5 spores. mL⁻¹ contre le moustique de la dengue (*Aedes aegypti*). Nos résultats sont en adéquation avec ces travaux confirmant que l'espèce *Aspergillus terreus* a également un effet entomopathogène contre des diptères nématocères. Les principales mycotoxines produites par l'espèce *A. terreus* sont le 9-Octadecenamamide, (Z)-, Octadecanamamide, 9-Octadecenamamide, N-diethyl-, N-Isobutyl-(6Z,8E)-decadienamamide, Lupenyl acetate, 9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester et γ -Tocopherol [195, 219]. L'acide 9,12-octadécanoïque un composé mineur a

été par contre largement signalé comme composant important des métabolites secondaires du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana*, et présentant une activité larvicide contre différentes larves d'insectes, y compris les moustiques [220].

La souche C_ITS (*A. leucanii*) avait la CL₅₀ la plus faible de 1.46×10^6 spore/ml. Par ailleurs, le temps léthal (TL₅₀) le plus court a été de 7.17 jours à la concentration de 2.2×10^6 spore/ml, après 72 heures suivant l'application fongique *in vitro* contre *H. pruni*

Ismail et al., [196] ont montré également que la souche de *A. lecanii* avait la CL₅₀ la plus faible (2.9×10^6 spore.ml⁻¹) en comparaison avec celle de *Metarhizium anisopliae* contre le puceron noir de la luzerne *Aphis craccivora*. D'autres champignons entomopathogènes *Paecilomyces farinosus*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps scarabaeicola* et *Nomuraea rileyi* étaient moins efficaces sur *Myzus persicae* et *Aphis gossypii* que l'espèce *L. lecanii* d'après Vu et al., [221]. Dans les conditions de température de 20-30 C° et une humidité de 45%, la pathogénicité de *L. lecanii* 41185 restait plus élevée à la CL₅₀ de (6.55×10^5 spore/ml) avec un temps léthal plus court de 1.53 jours à la concentration de 10^5 spore/ml.-Cette différence de pathogénicité pourrait être attribuée à des conditions de température et d'humidité spécifiques nécessaires à un pouvoir entomopathogène maximal des trois souches testées contre *A. fabae in vivo* et *in vitro*. Nous avons en effet montré la faible efficacité de la souche C_ITS (*A. lecanii*) contre *A. fabae in vivo* probablement en relation avec des conditions de température et d'humidité relative défavorables.

La souche A_ITS (*Penicillium* sp) était en revanche efficace contre *A. fabae in vivo* avec une CL₅₀ de 2.35×10^2 spore/ml après 10 jours de l'application. Cette concentration est plus faible que celle obtenue pour la souche *Penicillium verrucosum* avec une valeur de 9.8×10^4 spores.ml⁻¹, et un TL₅₀ de 37.5 heures [209] contre *Aphis gossypii*. Ce temps léthal du puceron *A. gossypii* est nettement plus court que celui enregistré pour *A. fabae* avec la souche *Penicillium* sp et qui est de 7.77 jours à la concentration 3.6×10^7 spore/ml.

IV.2. Potentiel entomopathogène des isolats bactériens testés

Dans le cadre de la présente étude, notre approche s'est focalisée sur l'isolement des bactéries du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* à partir du sol des citrus. Il est toujours intéressant d'explorer la diversité bactérienne, en particulier celle du sol, dans le but de contrôler biologiquement les insectes ravageurs [222]. Les bactéries de ces deux genres sont largement reconnues pour leur utilisation efficace en tant que genres de bactéries rhizosphériques dans la lutte biologique contre les insectes ravageurs [138].

Nous avons caractérisé vingt-quatre isolats du genre *Bacillus* et cinq isolats du genre *Pseudomonas*. Les bactéries de ce genre peuvent résister grâce à leurs spores, aux conditions environnementales défavorables au niveau du sol, ce qui influence sur leurs abondances comparées à celles des autres genres, [223].

Nous avons donc utilisé l'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S pour soutenir l'identification conventionnelle des isolats bactériens [224], et obtenir ainsi une compréhension complète de leurs caractérisations.

Les résultats de l'identification moléculaire ont montré que les isolats potentiellement pathogènes sur *H. pruni* font partie des genres *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Enterococcus*. Les Bacillaceae et Pseudomonaceae sont connues par leurs présences au niveau du sol [188, 225, 226]. Les Enterococcaceae, sont aussi isolés à partir du sol [227], mais également à partir des eaux de surface, de l'eau de mer ou sont trouvés en association avec des plantes [228] et à partir différents environnements, y compris agricoles [229, 230].

La modalité d'absorption des isolats testés par trempage des feuilles de fève et d'abricotier a permis d'évaluer l'effet insecticide des solutions bactériennes contre les pucerons *H. pruni* et *A. fabae*. Le mode de prise de nourriture chez les pucerons par utilisation des pièces buccales perforantes pour pénétrer dans les tissus végétaux et prélever la sève du phloème permet d'assurer le passage de la cellule bactérienne directement au niveau de l'intestin [231] où les bactéries de deux genres étudiés pourraient exercer leur mode d'action [232, 233].

L'évaluation d'un effet insecticide des bactéries entomopathogènes contre les pucerons est assurée généralement après 72 h du traitement, [234, 235]. Les mortalités des étaient en effet faibles au bout de 24 h et 48 h, mais plus élevées après 72 h du traitement par les isolats testés sur les deux aphides. L'ingestion des bactéries par les insectes et leurs modes d'actions sur les intestins qui causent le changement de couleurs comme un indice de mortalité seront manifestés après 3 jours d'application [236].

Les isolats sélectionnés B4, B22, B23, B24, B13, P2, P4 ont engendré des taux de mortalité importants sur les pucerons ciblés quelque soit la concentration testée. Un effet entomopathogène plus important se démarque avec des isolats bactériens potentiellement efficaces sélectionnés parmi plusieurs autres isolats issus de la rhizosphère. Paliwal *et al.* ; Elsharkawy *et al.*, [235, 237] ont sélectionné respectivement quatre souches qui ont les meilleurs effets à partir de 23 isolats et les six meilleures souches de 140 isolats bactériens du genre *Bacillus*.

D'après nos résultats, la souche P4 (*Enterococcus gallinarum*) était plus efficace contre les *H.pruni* avec une moyenne de mortalité de 85.5 % obtenue pour les quatre concentrations utilisées. La mortalité totale des pucerons (100 %) est enregistrée à la dose (C3 = 1×10^6 UFC/ml), après 72 heures du traitement bactérien.

Outre leur présence dans divers habitats environnementaux, les entérocoques sont naturellement présents en grand nombre dans les intestins des mammifères, des oiseaux, des reptiles et des insectes [238]. Plus particulièrement, *Enterococcus gallinarum*, a été isolé à partir de l'intestin de plusieurs espèces d'insectes, [239, 240]. Lorsque les espèces du genre *Enterococcus* se retrouvent dans l'hémolymphe, elles provoquent une septicémie et une mort rapide des insectes [241]. Dans ce contexte, plusieurs études ont été basées sur l'isolement des espèces de ce genre à partir de l'intestin de diverses espèces d'insectes et utilisées dans la lutte biologique.

L'espèce *E. gallinarum* a été isolée de l'intestin d'*Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae) [242] et a manifesté une forte mortalité sur le même insecte en comparaison avec d'autres isolats bactériens. Mason *et al.*, [241] ont mis en évidence l'effet insecticide de la bactérie intestinale *Enterococcus faecalis*, qui a causé des mortalités sur *Manduca sexta* après sa translocation de l'intestin vers l'hémolymphe à travers des pores provoqués via des toxines de la bactérie *Bacillus thuringiensis* pour assurer le passage des bactéries intestinales. Le genre *Enterococcus* n'a pas été testé contre les hémiptères, plus précisément sur les pucerons en raison de leur petite taille et de la difficulté à manipuler leurs intestins pour isoler ce genre. Dans la présente étude, *E. gallinarum* a été isolé à partir du sol et testé contre les pucerons *H. pruni* et *A.fabae* et où la pathogénicité de la bactérie a été prouvée.

Les bactéries intestinales persistent généralement à l'intérieur de l'insecte hôte sans provoquer de maladies. Cependant, elles peuvent devenir pathogènes en cas de stress, par exemple lorsque le système immunitaire de l'insecte s'affaiblit ou en raison de modifications de la composition du microbiote intestinal [243, 244]. L'intestin de l'insecte est naturellement colonisé par ces bactéries commensales, y compris les entérocoques, mais en répartition uniforme ou bien équilibrée. Une modification de l'abondance de ces bactéries peut causer un déséquilibre conduisant à des altérations épithéliales, et des troubles métaboliques par l'intermédiaire de ces bactéries [245, 246, 247, 248]. D'après les résultats obtenus, on peut émettre l'hypothèse que l'ingestion des bactéries *Enterococcus gallinarum* pourrait entraîner un déséquilibre au niveau du microbiote intestinal du puceron *H. pruni*, avec des perturbations intestinales. Les travaux de Thakur *et al.*, [249] ont montré qu'il existe deux mécanismes

permettant aux bactéries de tuer les insectes. Dans une première étape, la toxine bactérienne seule, provoque la famine mais pas la septicémie puis dans une deuxième étape, la septicémie est causée par le microbiote, principalement *Enterobacter* spp et *Enterococcus* spp. Ces derniers transitent de l'intestin moyen à l'hémolymphe via les pores créés par la toxine. Ryu *et al.*, [250] et Vacheron *et al.*, [251] s'accordent que la perturbation au niveau de la diversité microbienne intestinale due à une infection bactérienne cause directement la mort de l'insecte.

Concernant l'efficacité insecticide des *Pseudomonas*, nous avons montré que la souche P2 (*Pseudomonas* sp) a également engendré une mortalité importante de l'ordre de 83 % après 72 h du traitement avec la plus faible dose 1×10^5 UFC/ml. Nos résultats s'alignent avec ceux obtenus par Paliwal *et al.*, [235] qui ont démontré que *Pseudomonas fluorescens* a manifesté une mortalité de 100 % après 72 h du traitement, contre le puceron vert du pêcher *Myzus persicae* mais avec une concentration plus élevée 1×10^7 UFC/ml. Manjula *et al.*, [252] ont aussi confirmé cette efficacité par application foliaire de 1% de *P. fluorescens* sur le puceron du cotonnier *Aphis gossypii* en causant 65,3% de réduction de la population aphidienne. *Pseudomonas* est une bactérie entomopathogène avec une efficacité insecticide contre plusieurs ravageurs agricoles dont les pucerons [253], *Drosophila melanogaster* (Meigen), *S. littoralis* et *P. xylostella*, [123, 254], mais aussi contre les larves L₅ du criquet migrateur *Locusta migratoria* [138].

L'ingestion orale de *Pseudomonas* a déjà été rapportée comme causant des lésions de la membrane péritrophique et une altération de l'intégrité intestinale [255]. La chitine, un polymère de glucides, est une substance largement présente dans le règne animal. Elle joue un rôle essentiel en tant que composant principal de diverses structures anatomiques. C'est le majeur élément structurel de diverses parties du corps des insectes et des vers, représentant environ 50% de la cuticule, les intestins et certaines membranes [251]. Les bactéries de *Pseudomonas* produisent des chitinases [256] qui hydrolysent l'exosquelette des insectes et la membrane péritrophique des intestins [257, 258]. La chitinase dans l'intestin provoque l'expansion des mitochondries, du réticulum endoplasmique et des vacuoles, suivie de la lyse des cellules épithéliales entraînant la décomposition de l'intestin moyen. Ce mécanisme empêche l'insecte de se nourrir et conduit finalement à la mort [232]. Les chitinases perturbent les membranes péritrophiques et réduisent la digestion [259, 256]. En plus de la production de chitinase, *Pseudomonas* sp produit également la toxine insecticide *fit* causant des altérations intestinales [260, 261]. L'effet entomopathogène des *Pseudomonas* isolés et testés en comparaison avec celui de la souche de référence *Pf* peut s'expliquer par la

spécificité à l'insecte hôte, sachant que la souche référencée utilisée dans notre travail a été utilisée pour contrôler les larves du criquet migrateur *Locusta migratoria* et *Galleria mellonella* [145]. Paliwal *et al.*, [235] signalent que la même souche de *Pseudomonas fluorescens* (PfR37) a manifesté des taux de mortalité différents sur deux espèces différentes, de même ordre et famille d'insectes.

L'identification moléculaire des souches B4 (*Lysinibacillus fusiformis*), *Bacillus thuringiensis* (B24, B23, B22, B13), a montré leur appartenance au genre *Bacillus*. Les bactéries du genre *Bacillus* sont étudiées depuis longtemps pour leur effet entomopathogène contre les invertébrés, principalement les insectes [162]. *B. thuringiensis* est la bactérie entomopathogène la plus utilisée contre divers ordres d'insectes [263, 264], diptères, coléoptères et lépidoptères et aussi, Orthoptères et Hemiptères [265, 266]. Les produits dérivés de *Bacillus thuringiensis* constituent une majorité substantielle, précisément 95 %, du marché mondial des biopesticides, et de nombreuses sociétés commerciales ont introduit et promu des produits à base de *B. thuringiensis*. En 1998, plus de 200 produits dérivés de *B. thuringiensis* étaient utilisés contre des ravageurs rien qu'aux États-Unis [265]. D'autres espèces de *Bacillus* sont également utilisées dans la lutte contre les insectes nuisibles, comme *Lysinibacillus sphaericus* (*Bacillus sphaericus*) (Bacillales : Planococcaceae) [267], qui est utilisé pour attaquer les larves de moustiques [268].

Nos résultats ont montré que toutes les souches de *Bacillus thuringiensis* sont responsables de mortalités très élevées. Les taux létaux des souches B23 et B22 sont de l'ordre de 96 % et 92 %, respectivement, chez les pucerons *H. pruni* traités avec la concentration la plus faible (C4 = 1×10^5 CFU/ml). Les souches B22 et B24 ont causé la mort de 85% et 83% de la population d'*A. fabae* aux concentrations respectives C3 : 1×10^6 UFC/ml et C2 : 1×10^7 UFC/ml), 72 h après application des traitements bactériens. Nos résultats sont également soutenus par Alamuratov *et al.*, [269] qui a démontré que *B. thuringiensis* a un effet entomopathogène sur *H. pruni* après 72 heures à la concentration de 2×10^8 UFC/ml.

Cependant, en testant différentes souches de *Bt* à cette même concentration, ils ont observé des différences de mortalités aphidiennes avec un taux maximal de 69.5%. Ces constatations sont comparables à celles observées dans notre étude. Une variation des taux de mortalités était obtenue avec les autres isolats de *Bacillus thuringiensis* B13 et B24 qui ont généré un faible potentiel insecticide par rapport aux souches (B23, B22) de la même espèce *B. thuringiensis*. Des travaux antérieurs ont également montré la différence de potentiel insecticide de plusieurs souches de *B. thuringiensis* isolées du sol dans le même ordre que les

insectes lépidoptères et diptères [50]. La différence de potentiel insecticide des espèces paires contre le même insecte avec une dose similaire peut s'expliquer par la spécificité d'hôte de nombreuses sous-espèces de *B. thuringiensis*. Plus de 60 sous-espèces de la bactérie *B. thuringiensis* ont été décrites à ce jour, les toxines qu'elles produisent diffèrent par la spécificité de leur action insecticide [233, 270]. Par conséquent, les différentes souches de *Bacillus thuringiensis* ne sont efficaces que contre une gamme étroite de cibles. c'est pour cette raison que les chercheurs consacrent beaucoup de temps et d'efforts à explorer de manière continue de nouvelles souches de *Bacillus thuringiensis* ainsi que des toxines insecticides [252], ce qui explique dans cette étude la déférence des potentiel insecticides des mêmes groupes d'espèces contre le même insecte cible et même entre les deux insectes testés dans ce travail (*H. pruni*, *A. fabae*), et assure également les résultats du contrôle positif utilisé dans cette étude *Bt* (HF911367) sachant qu'il est également utilisé contre *Locusta migratoria* (Lepidoptera : Pyralidae) [145] et *Galleria mellonella* (Orthoptera : Acrididae) [271].

Par ailleurs, la souche B4 (*Lysinibacillus fusiformis*), ou *Bacillus sphaericus* subsp *fusiformis* [272, 273] a manifesté un taux élevé des mortalités à l'égard des aphides de l'ordre de 85% à la plus faible concentration testée ($C_4 = 1 \times 10^5$ UFC/ml). Le genre *Lysinibacillus* comprend des bactéries mésophiles, naturelles, toxiques pour les insectes et les sols. L'espèce *Lysinibacillus sphaericus* a déjà été prouvée par son effet insecticide important notamment contre les diptères, de l'espèce *Anopheles aconitus* (Diptera : Culicidae), [274], et contre *Locusta migratoria* (Orthoptera : Acrididae) [145]. L'espèce *Lysinibacillus fusiformis* a également été efficace contre certains insectes et acariens nuisibles tels *Galleria mellonella* (Lepidoptera : Pyralidae) [275], *Drosophila melanogaster* (Diptera : Drosophilidae) [276] et *Varroa destructor* (Mesostigmata : Varroidae) [277]. Cependant, les *Lysinibacillus* sp en général n'ont pas été testés contre les hémiptères, y compris les pucerons.

L'activité insecticide de cette bactérie est basée sur la synthèse de toxines cristallines (*Cry* et *Cyt*) combinées à des corps parasporaux formés pendant la phase de sporulation. Par ailleurs, pendant la croissance végétative (VIP), la cellule produit et libère des toxines supplémentaires et des facteurs de virulence qui contribuent à l'action insecticide de cette bactérie [278]. Après ingestion, ces toxines se fixent sélectivement sur les récepteurs de l'intestin moyen des insectes. Elles déclenchent la formation de pores modifiant la perméabilité de la membrane épithéliale et perturbent en conséquence les fonctions de la barrière intestinale et peut même provoquer une septicémie bactérienne, qui entraîne finalement la mort de l'insecte [96]. En réalité, 3 à 13 % de la membrane péritrophique des

intestins d'insectes sont constitués de chitine, un polymère linéaire de b-1,4-N-acétylglucosamine (GlcNAC). Les séquences variables du gène de la toxine indiquent une affinité variable pour les récepteurs de l'intestin moyen des insectes, ce qui explique pourquoi les différentes souches ont des protéines de toxines insecticides différentes et des caractéristiques insecticides spécifiques à la souche [279].

Les bactéries du genre *Lysinibacillus* exercent leur pouvoir entomopathogène en sécrétant des enzymes comme les chitinases [222]. Ces enzymes microbiennes ont des propriétés antibactériennes, antifongiques, insecticides et nématicides en affaiblissant et en décomposant les parois cellulaires de plusieurs parasites et maladies [280]. D'autre part, les cuticules d'insectes peuvent contenir jusqu'à 40 % de chitine en masse sèche [281]. Dans un processus similaire, les toxines Mtx et les protéines cristallines correspondantes BinA et BinB sont produites par les *Lysinibacillus* sp, qui agissent contre les moustiques et les mouches noires [186, 282]. Ces protéines jouent un rôle essentiel dans le processus de mortalité des larves en capturant ces toxines et en les associant à un récepteur présent à la surface des cellules intestinales de l'insecte [283].

La concentration létale la plus faible pour tuer 50% de la population de *H. pruni*, 72 heures après traitement avec les isolats sélectionnés ayant montré un potentiel entomopathogène élevé quel que soit les concentrations testées était de 1.08×10^2 CFU/ml pour l'isolat P4 (*Enterococcus gallinarum*) qui s'est avéré être le plus puissant, présentant la CL₅₀ la plus faible.

Plusieurs études ont montré que le genre *Enterococcus* fait partie du microbiote intestinal des insectes [238, 239, 240]. Ainsi, l'ingestion d'une faible quantité de ces bactéries peut provoquer des perturbations intestinales avec les bactéries commensales du même genre, ce qui explique que cette faible dose pourrait provoquer la mortalité de populations du puceron *Hyalopterus pruni*. Par ailleurs, la plus faible CL₉₀ était de 1.16×10^3 UFC/ml pour l'isolat P2 (*Pseudomonas* sp.).

Paliwal *et al.*, [235] a également constaté qu'une faible dose (5.24×10^1 UFC/ml) de la bactérie *Pseudomonas fluorescens* était suffisante pour provoquer 50 % de mortalité dans les populations de plusieurs espèces de pucerons après 72 heures de traitement. Cela explique les résultats du TL₅₀ le plus court enregistré dans la présente étude, où il a été constaté que *Pseudomonas* sp (P2) provoquait 50 % de mortalité chez les pucerons *H. pruni* traités avec la concentration C4 1×10^5 UFC/ml après seulement 1.4 jours. La souche P4 (*Enterococcus*

gallinarum) a provoqué une mortalité de 90 % des populations de *H. pruni* après traitement avec la concentration C3 1×10^6 UFC/ml au bout de 2.1 jours, ce qui est considéré comme le TL₉₀ le plus court parmi les autres temps létaux des souches testées. Ces résultats montrent que les deux souches P4 et P2 ont le meilleur potentiel insecticide contre les pucerons *H. pruni* dans notre étude. Un insecte est dit sensible à un insecticide donné si une faible dose suffit à provoquer sa mort [284].

En ce qui concerne le genre *Bacillus*, nous avons observé que les deux souches de *Bacillus thuringiensis*, B22 et B23, ont donné des niveaux plus élevés de CL et TL que les autres souches potentiellement entomopathogènes contre les pucerons. Une étude précédente de Alamuratov *et al.*, [269] a mis en évidence que les souches de *Bacillus thuringiensis* testées ont causé une mortalité variante entre 35,2% et 63,5% après 72 heures de traitement avec la concentration de 2×10^8 UFC/ml. De ce qui précède, nous pouvons déduire de cette étude que les *Bacillus thuringiensis* isolés et identifiés n'ont pas les meilleurs effets insecticides contre les pucerons farineux du prunier (*Hyalopterus pruni*) comparés à ceux de *Pseudomonas* et *Enterococcus* après 72 heures de traitement.

Les variations dans les mortalités observées peuvent être attribuées à des disparités dans la présence de gènes insecticides, à des variations dans les souches d'insectes utilisées ou dans la méthodologie d'essai biologique appliquée [285] et plus précisément à la spécificité de l'hôte, pour laquelle plusieurs études ont signalé des différences dans le potentiel insecticide de plusieurs souches de la même espèce (*Bacillus thuringiensis*) testées sur le même insecte cible [183, 286]. En effet, les résultats de ce travail mettent en évidence une meilleure efficacité de la souche B24 parmi toutes les souches de *Bt* identifiées et testées sur le puceron *A. fabae*. La souche B24 a manifesté la CL₅₀ la plus faible de 7.92×10^5 après 72h du traitement. De plus, la toxicité de *Bacillus thuringiensis* dépend de la quantité et des dimensions de la protéine cristalline présente dans la souche bactérienne [287]. Ce phénomène pourrait expliquer les différents degrés de toxicité observés entre des isolats distincts du même genre [286]. Ceci explique également la différence de CL et TL entre les deux souches B23 et B22, et leurs effets contre les deux espèces de pucerons testés *A.fabae* et *H.pruni*. Le potentiel insecticide de *Bacillus thuringiensis* contre les pucerons peut être déterminé en utilisant les toxines de ces bactéries après extraction et sélection, Porcar *et al.*, [233] ont trouvé différents potentiels insecticides sur des pucerons du pois (*Acyrtosiphon pisum*) traités avec des toxines de *Bacillus thuringiensis* ou la toxine *Cry4* a montré un taux de mortalité de 90% après trois jours de traitement. Par ailleurs, la comparaison entre les

toxines *Cry 1*, *Cry 03* et *Cry 04* et l'utilisation directe de cellules bactériennes de *Bacillus thuringiensis* ont donné le meilleur taux de mortalité contre *Cydalima perspectalis* (Walker,1859) (Lepidoptera : Crambidae : Spilomelinae) que les toxines de cette bactérie [288].

IV.3 Comparaison d'effet insecticide entre les bactéries et champignons entomopathogènes

Les résultats de l'effet des champignons et bactéries entomopathogènes dans cette présente étude contre deux modèles d'insectes ravageurs des cultures d'importance économique, ont montré que les souches bactériennes ont le meilleur potentiel insecticide contre les deux insectes cibles, où d'après une comparaison avec les souches fongiques dans les mêmes conditions des essais biologiques (*H. pruni, in vitro*), les souches bactériennes ont manifesté un taux de mortalité total (100 %) et la plus faible CL₅₀ de 1.08×10^2 . Parallèlement, les souches fongiques ont causé 68.88 % du meilleur taux de mortalité et la plus faible CL₅₀ de 1.46×10^6 spores/ml. Cette différence est peut expliquer par les facteurs de virulences favorables aux modes d'actions des champignons où ils nécessitent une température ambiante de 25 °C avec une humidité relative (70 % – 75 %). Une faible humidité entraîne une réduction significative de l'infectivité de plusieurs champignons [289]. Les champignons ont besoin d'une humidité très élevée pour sporuler, germer et infecter les cadavres d'insectes [290]. Vu *et al.*, [221] Ils ont approuvé ça, où à une température de 25 °C et une humidité relative de 75 %, *L. lecanii* 41,185 a montré un pouvoir pathogène très virulent (100 %) contre *M. persicae* et *A. gossypii* après 5,2 jours d'application respectivement.

Conclusion

Conclusion

Dans le cadre de notre travail, notre étude consiste à isoler et caractériser des champignons isolés à partir des cadavres d'insectes inféodés aux citrus et des bactéries à partir du sol cultivé de citrus et des, suivi de l'évaluation de leurs potentiels insecticides contre le puceron farineux *Hyalopterus pruni* et le puceron noir de la fève *Aphis fabae*.

L'isolement et l'identification par la caractérisation moléculaire des champignons entomopathogènes isolés à partir des cadavres d'insectes inféodes aux citrus, a révélé trois souches sélectionnées d'après leur pouvoir insecticide : *Penicillium sp* (A ITS), *Aspergillus terreus* (B ITS) et *Lecanicillium lecanii* (C ITS). Notre étude a démontré la toxicité de différentes souches lors des bio essais de sélection *in vitro* sur le puceron farineux du prunier, *Hyalopterus pruni* (Geoffroy 1762), que les trois souches fongiques étaient efficaces par un taux de mortalité supérieur à 65% à la concentration 2.2×10^7 spore/ml après 10 jours d'application *in vitro* aux conditions contrôlées. On a enregistré les mortalités de 65.95 % (A ITS), 68.88 % (B ITS) et 68.33 % (C ITS). Donc les trois souches ont subi une application à différentes concentrations contre *H. pruni* pour évaluer leur potentiel insecticide contre cet insecte par les calculs de concentrations létales 50% (CL_{50}) pour déterminer la souche la plus potentiellement toxique, où la souche C ITS s'est avérée la plus performante avec une CL_{50} la plus faible de 1.46×10^6 spore/ml en comparaison aux autres souches avec les valeurs de CL_{50} : 1.75×10^6 spore/ml et 5.78×10^6 spore/ml pour les souches B et C respectivement et qu'elles ne sont pas vraiment déférentes. Nos résultats indiquent que les trois souches fongiques possèdent un potentiel entomopathogène important contre le puceron farineux de prunier *Hyalopterus pruni* dans les conditions contrôlées de laboratoire étudiés (*in vitro*) et ce qui affirme que les trois souches caractérisées font parties des champignons entomopathogènes

Pour les essais biologiques des souches fongiques contre *A.fabae*, où la souche fongique A ITS (*Penicillium sp*) a causé un effet insecticide important, avec un taux de mortalité 62.33 % chez les pucerons testés, après 10 jours d'application à la concentration 3.6×10^7 spores / ml *in vivo*, comparée aux autres souches qui ont manifesté des faibles taux de mortalité B ITS (43.99 %) (*Aspergillus terreus*) C ITS (37.47 %) (*Lecanicillium lecanii*). Donc, les bioessais aux différentes concentrations ont été réalisés sur la souche A ITS, tandis que la CL_{50} de cette souche était de 9.29×10^6 spores/ml, ce qui souligne son potentiel insecticide *in vivo* contre le puceron ravageur *A.fabae*. En parallèle, les trois souches ont réveillé des faibles effets contre le puceron *A.fabae* *in vitro* avec un taux de mortalité inférieur à 33 %.

L'isolement, l'identification et la caractérisation des bactéries entomopathogènes présentes au niveau du sol des citrus a donné 7 souches bactériennes potentiellement toxiques appartenant à trois différents genres: *Lysinibacillus fusiformis* (B4), *Bacillus thuringiensis* (B13), *Bacillus thuringiensis* (B22), *Bacillus thuringiensis* (B23), *Bacillus thuringiensis* (B24), *Pseudomonas sp* (P2), *Enterococcus gallinarum* (P4), où P4 avait le meilleur potentiel insecticide après 72 heures d'application contre le puceron farineux du prunier, *H.pruni* avec une valeur de la Cl_{50} 1.08×10^2 UFC/ml et avec un taux de mortalité total (100 %) *in vitro* suivi de (B23), (B22), (B4), (P2), (B13) et (B24), qui ont entraîné des taux de 96 %, 91 %, 85 %, 83 %, 65 %.

Nous avons sélectionné cinq isolats bactériens qui ont manifesté des taux de mortalité importants même à différentes doses contre le puceron farineux du prunier *Hyalopterus pruni* (B22, B23, B24, P2 et P4), dans le but d'évaluer leur pouvoir insecticide sur l'autre insecte ravageur *A.fabae* *in vitro*, les deux souches B22 et P4 ont causé le même taux de mortalité (85,71 %) aux concentrations C3 (1×10^6 UFC/ml) et C1 (1×10^8 UFC/ml) respectivement, suivies par les souches B24 (83.33 %) et B23 (72.72 %) à la concentration 1×10^7 UFC/ml (C2), par contre la souche P2 (*Pseudomonas sp*) qu'elle était pas efficace contre *A.fabae* *in vitro*. La détermination du potentiel insecticide de ces souches entomopathogènes par le calcul de la CL_{50} la plus faible (7.92×10^5 UFC/ml) a été manifestée par la souche B24 (*Bacillus thuringiensis*).

D'après cette présente étude, et dans le cadre de la recherche du potentiel insecticide des entomopathogènes disponibles aux citrus. Nous avons constaté que les vergers des citrus sont riches par la disponibilité et la biodiversité des bactéries en champignons entomopathogènes qui ont vraiment un effet insecticide sur deux modèles de ravageurs des cultures à une importance économique. Les résultats des essais biologiques par nos souches fongiques et bactériennes ont démontré que les bactéries ont le meilleur effet de contrôler les insectes ravageurs par leur simplicité à la préparation d'inoculum et par les conditions culturelles non exigeantes. Par contre, les champignons nécessitent la disponibilité de certaines conditions comme l'humidité relative et une température ambiante, sachant que les spores doivent être bien développées et prétendre à exercer leur mode d'action, et surtout le temps d'exposition.

Comme perspective dans le cadre des travaux scientifiques supplémentaires pour compléter les résultats trouvés. Ces souches doivent être testées contre d'autres genres d'insectes ravageurs dans le but d'évaluer leurs pouvoirs entomopathogènes sur un large spectre d'insectes. A la fin, ce travail donnera aussi une opportunité de développer et étudier la molécule active et les toxines des souches fongiques et bactériens isolés dans cette présente étude.

Références bibliographiques

- [1]. Bala, K., Sood, A. K., Pathania, V. S., Thakur, S. (2018). Effect of plant nutrition in insect pest management: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(4), 2737-2742.
- [2]. Bernays, E.A., Chapman, R.F. (1994). Host-Plant Selection by Phytophagous Insects. In: *Contemporary Topics in Entomology*, vol 2. Springer, New York, pp 95-165.
- [3]. Blackman, R. L and Eastop, V. F. (2000). *Aphids on the World's Crops—An Identification and Information Guide*. The Natural History Museum. John Wiley and Sons, Ltd., New York.
- [4]. Kimura, K., Usugi T., Hoshi, H., Kato, A., Ono, T., Koyano, S., Kagiwada, S., Nishio T., Tsuda S. (2016). Surveys of viruliferous alate aphid of Plum pox virus in Prunus mume orchards in Japan. *Plant Dis*, 100(1), 40-48. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-15-0540-RE>.
- [5]. Rousselin, A., Bevacqua, D., Sauge, M. H., Lescourret, F., Mody K., Jordan, M. O. (2017). Harnessing the aphid life cycle to reduce insecticide reliance in apple and peach orchards. *A review Agron Sustain Dev*, 37(38), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0444-8>.
- [6]. Geoffroy, E.L. (1762). *Histoire abrégée des Insectes qui se trouvent aux environs de Paris : dans laquelle ces animaux sont rangés suivant un ordre méthodique*, Paris, France.
- [7]. Cronin, J.T., Bhattarai, G.P., Allen, W.J., Meyerson, L.A. (2015). Biogeography of a plant invasion: plant-herbivore interactions. *Ecology*, 96(4), 1115-1127. <https://doi.org/10.1890/14-1091.1>.
- [8]. Lozier, J. D., Footitt, R. G., Miller G. L., Mills, J., Roderick, G. K. (2008). Molecular and morphological evaluation of the aphid genus *Hyalopterus* Koch (Insecta: Hemiptera: Aphididae), with a description of a new species. *Zootaxa*, 1688(1), 1-19. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1688.1.1>.
- [9]. Lozier, J. D., Roderick, G. K., Mills, N. J. (2009). Tracing the invasion history of mealy plum aphid, *Hyalopterus pruni* (Hemiptera: Aphididae), in North America: a population genetics approach. *Biol Invasions*, 11(2), 299-314. <https://doi.org/10.1007/s10530-008-9248-8>.
- [10]. Isac, M., Preda, S., Marcu, M. (1998). Aphid species—vectors of plum pox virus. *Acta Virologica*, 42(4), 233-234.
- [11]. Elibuyuk, IO. (2003). Natural spread of plum pox virus in Ankara, Turkey. *Journal of Phytopathology*, 151(11-12), 617-619. <https://doi.org/10.1046/j.0931-1785.2003.00775.x>.
- [12]. Hazir, A., Yurtmen, M., Fidan, H. (2021). Potential Aphid (Hemiptera: Aphididae) Vectors of Plum-pox Virus (Virus:Potyviridae) and Status of Sharka Disease in Stone Fruit Orchards in the East Mediterranean Region of Turkey. *Journal of Agricultural Sciences*, 7 (4), 484-492. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.722483>.
- [13]. Scopoli, J. A. (1763). In *Entomologia Carniolica exhibens insecta Carnioliae indigena et distributa in ordines, genera, species, varietates. Methodo Linnaeana*. Ioannis Thomae Trattner, Vienna, 420 pp.

- [14]. Gratwick, M. (1992). Apple and Pear midges. Ed, Chapman and Hall, London, UK. Crop Pests in the UK. Collected Edition of MAFF Leaflets.
- [15]. Michaud, J. P., Grant, A. K. (2003). IPM-compatibility of foliar insecticides for citrus: indices derived from toxicity to beneficial insects from four orders. *J Insect Sci*, 3 (1), 1-10. <https://doi.org/10.1093/jis/3.1.18>.
- [16]. Van-Lenteren, J. C., Bolckmans, K., Köhl, J., Ravensberg, W. J., Urbaneja, A. (2018) Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl*, 63, 39-59.
- [17]. İzgi, Ü., Güven, Ö. (2016). Kahramanmaraş Başkonuş ormanlık alanlarından izole edilen entomopatojen funguslar. *Bitki Koruma Bülteni*, 54 (3), 201-209.
- [18]. Kouassi, M. (2001). Les possibilités de la lutte microbiologique. Emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. *Vertigo*, 2(2). <https://doi.org/10.4000/vertigo.4091>.
- [19]. Rajadurai, G., Anandakumar, S., Umapathi, M. (2022). Entomopathogenic Microorganisms in Insect Pest Management. *Biotica. Research Today*, 4(12), 827-829.
- [20]. Humber, R. A. (2008). Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3), 262-266.
- [21]. Hajek, A.E., Gardescu, S., Delalibera, Jr. (2016). Classical biological control of insects and mites: a worldwide catalogue of pathogen and nematode introductions Vol 06. Morgantown, WV: FHTET, USDA Forest Service.
- [22]. Pell, J. K., Eilenberg, J., Hajek, A. E., Steinkraus, D. C. (2001). Biology, ecology and pest management potential of Entomophthorales. In T. M. Butt, C. Jackson, & N. Magan 140 (Eds.), *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential* (pp. 71-153). Wallingford, UK: CAB International.
- [23]. Devi, P. S. V., Duraimurugan, P., Chandrika, K. S. V. P. (2019). *Bacillus thuringiensis*-based nanopesticides for crop protection. *Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives*, (10), 264-269. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815829-6.00010-3>.
- [24]. Sattar, S., Maiti, M. K. (2011). Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest. *J Microbiol Biotechnol*, 21(9), 937-946. <https://doi.org/10.4014/jmb.1105.05030>.
- [25]. Badran, A., Guzov, V., Huai, Q. (2016). Continuous evolution of *Bacillus thuringiensis* toxins overcomes insect resistance. *Nature*, 533, 58-63. <https://doi.org/10.1038/nature17938>
- [26]. Kupferschmied, P., Maurhofer, M., Keel C. (2013). Promise for plant pest control: root-associated pseudomonads with insecticidal activities. *Front Plant Sci*, 4(287), 1-17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00287>.
- [27]. Suganthi, M., Senthilkumar, P., Arvinth, S., Chandrashekara, KN. (2017). Chitinase from *Pseudomonas fluorescens* and its insecticidal activity against *Helopeltis theivora*. *J Gen Appl Microbiol*, 63(4), 222-227. <https://doi.org/10.2323/jgam.2016.11.001>.

- [28]. Fierer, N., Bradford, M. A., & Jackson, R. B. (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 88(6), 1354-1364. <https://doi.org/10.1890/05-1839>
- [29]. Jobbágy, E. G., Jackson, R. B. (2000). The vertical distribution of soil organic carbon and its relation to climate and vegetation. *Ecological applications*, 10(2), 423-436. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01891.x>
- [30]. Veldkamp, E., Becker, A., Schwendenmann, L., Clark, D. A., Schulte-Bisping, H. (2003). Substantial labile carbon stocks and microbial activity in deeply weathered soils below a tropical wet forest. *Global change biology*, 9(8), 1171-1184. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7008-7018.2005>
- [31]. Mathew, L.K., Sengupta, S., Kawakami, A., Andreasen, E.A., Löhr, C.V., Loynes, C.A., Renshaw, S.A., Peterson, R.T., and Tanguay, R.L. (2007). Unraveling tissue regeneration pathways using chemical genetics. *The Journal of biological chemistry*. 282(48), 35202-35210.
- [32]. Ferhat M.A., Meklati B.Y. et Chemat F. (2010). Citrus d'Algérie : les huiles essentielles et leurs procédés d'extraction. ED. OPU, n°5130. Alger. 157 p.
- [33]. I.T.A.F, 2002 Relevés climatologiques. Manuscrit I.T.A.F., Boufarik, 18 p.
- [34]. Hullé, M., Tuepeau–Ait-ighil, E., Robert, Y., monet, Y. (1998) les pucerons des plantes inanciphères. *Cycle biologique et activité de vol*. Ed Act. A I.N.R.A. fanis P, 31-52.
- [35]. Bonnemaïson, L. (1962). Etude de quelques facteurs de la fécondité et de la fertilité chez la Noctuelle du chou (*Mamestra brassicae* L.) (Lep. Noctuidae). VI. — Recherches sur «l'effet de groupe» chez les femelles. Bulletin de la Société entomologique de France, 67(7-8), 146-154. doi: 10.3406/bsef.1962.20658.
- [36]. TURPEAU-AIT IGHIL, E., DEDRYVER, C. A., dCHAUBET, B. (2011). Les pucerons des grandes cultures : Cycles biologiques et activités de vol. PARIS CEDEX 12 (149 Rue de Bercy, 75 595, FRANCE) : ACTA - LES INSTITUTS TECHNIQUES AGRICOLES. ISBN/ISSN/EAN: 978-2-7592-1026-8. 136 p.
- [37]. Boni, S. B., Mwashimaha, R. A., Mlowe, N., Sotelo-Cardona, P., Nordey, T. (2021). Efficacy of indigenous entomopathogenic fungi against the black aphid, *Aphis fabae* Scopoli under controlled conditions in Tanzania. *Int J Trop Insect Sci*, 41, 1643–1651. <https://doi.org/10.1007/s42690-020-00365-8>
- [38]. Hassan, W. A., Assaf L. H., Abdullah, S. K. (2012). Occurrence of entomopathogenic and other opportunistic fungi in soil collected from insect hibernation sites and evaluation of their entomopathogenic potential. *Bull. Iraq nat.Hist.Mus*, 12(1), 19-27.
- [39]. Blackman, R and Eastop, V. (2007). Taxonomic issues. In Van Emden H. F. and Harrington R., Aphid as crop pests. Edition CABI, U. K, 1-29.
- [40]. Aroun, M. E. F. (1985). Les aphides et leurs ennemis naturels en vergers d'Agrumes de la Mitidja. Mémoire de Magister en Agronomie, Institut National Agronomique, El Harrach, Alger, 125 p.

- [41]. Harmel, N., Francis, F., Haubruge, E., Giordanengo, P. (2008). Physiologie des interactions. *Cahiers Agricultures*, 17, 395-400.
- [42]. Kamphuis, L. G., Lichtenzveig, J., Peng, K., Guo, S., Klingler, J., Siddique, K. H. M., Singh, K. B. (2013). Characterization and genetic dissection of resistance to spotted alfalfa aphid (*Therioaphis trifolii*) in *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*, 64(16), 5157-5172. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert305>.
- [43]. Blackman, R. L and Eastop, V. F (2006). Aphids on World's the Herbaceous Plants and Shrubs. Wiley, New York.
- [44]. Hullé, M., Turpeau, E., Leclant, F. (1998). Les pucerons des arbres fruitiers : Cycles biologiques et activités de vol. INRA, 80.
- [45]. Jerraya, A. (2003). Principaux nuisibles des plantes cultivées et des denrées stockées en Afrique dunord: Leur biologie, leurs ennemis naturels, leurs dégâts et leur contrôle. *Climat pub*, Tunisie, 415.
- [46]. John, L. C. (2001). Order Homoptera—Aphids, Leaf- and Planthoppers, Psyllids and Whiteflies. *Handbook of Vegetable Pests*, 279-346. <https://doi.org/10.1016/B978-012158861-8/50009-0>.
- [47]. Dixon, A. F. G. (1998). Aphid Ecology: An Optimization Approach. Chapman & Hall.
- [48]. KENNEDY, J. S., BOOTH, C. O., KERSHAW, W.J.S. (1959). HOST FINDING BY APHIDS IN THE FIELD: APHIS FABAE SCOP. (GYNOPARAE) AND BREVICORYNE BRASSICAE L.; WITH A RE-APPRAISAL OF THE ROLE OF HOST-FINDING BEHAVIOUR IN VIRUS SPREAD. *Annals of Applied Biology*, 47(3), 424-444. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1959.tb07277.x>.
- [49]. Smaili, R and Medjouz, K. (2017). La detection serologique et biologique du virus ppv (SHARKA).Mém.Magister. UNIVERSITE SAAD DAHLAB BLIDA 1.p23.
- [50]. INRA. (2015). Institute Nationale de la Recherche Agronomique < <https://www.inra.org.ma/> >
- [51]. Capinera, J. L. (2001). Handbook of Vegetable Pests. Academic Press, New York.
- [52]. FERICEAN, L.M., HORABLAGA, N.M., BĂNĂȚEAN – DUNEA, I., RADA, O., OSTAN, M. (2012). THE BEHAVIOUR, LIFE CYCLE AND BIOMETRICAL MEASUREMENTS OF APHIS FABAE. *Research Journal of Agricultural Science*, 44 (4), 31-37.
- [53]. INRA. (2016). Encyclop'Aphid. Institut National de la Recherche Agronomique.
- [54]. Masetti, A., Luchetti, A., Sommaggio, D., Burgio, G., Mantovani, B. (2006). Phylogeny of *Chrysotoxum* species (Diptera: Syrphidae) inferred from morphological and molecular characters. *European Journal of Entomology*, 103, 459-467.
- [55]. Hullé, M. (1998). Les pucerons des arbres fruitiers. INRA, Paris, p. 77. 45.
- [56]. Christelle, L. (2007). Dynamique d'un système hôte-parasitoïde en environnement spatialement hétérogène et lutte biologique Application au puceron *Aphis gossypii* et au parasitoïde *Lysiphlebus testaceipes* en serre de melons. Thèse Doctorat., Agro Paris Tech, Paris, 43-44.

- [57]. Giordanengo, P., Febvay, G., Rahbé, Y. (2007). Comment les pucerons manipulent les plantes. *Biofutur*, 279(37), 35-38.
- [58]. Brault, V., Uzest, M., Monsion, B., Jacquot, E., Blanc, S. (2010). Aphids as transport devices for plant viruses Les pucerons, un moyen de transport des virus de plante. *C. R. Biologies*, 333, 525-531.
- [59]. BAY-AHMED, Salah. (2013). Les pucerons dans la région de Ghardaïa : biodiversité et importance dans un champ de fève (*Vicia faba* L.) p 31.
- [60]. Candresse, T et Decroocq, V. (2007). Résistance génétique au virus de la sharka chez les Prunus : sélection conventionnelle et nouvelles stratégies. *Innovations Agronomiques*, INRAE.
- [61]. Leclant, F. (2000). Les pucerons des plantes cultivées culture fruitière. Association de coordination technique agricole. 128 p.
- [62]. Érsek, L. (2016). *Prunus cerasifera*, Hungary, Budapest, 20.v.2016. Photographieniversity of California, Division of Agriculture and Natural Resources. 461 p.
- [63]. Blackman, R and Eastop, V. (2007). Taxonomic issues. In Van Emden H. F. and Harrington R., *Aphid as crop pests*. Edition CABI, U. K, 1-29.
- [64]. Karungi, J., Agamile, P., Kovach, J., Kyamanywa, S. (2010). Cover cropping and novel pesticide usage in the management of pests of hot pepper (*Capsicum chinense*). *International Journal of Tropical Insect Science*, 30(2), 84-92.
- [65]. Dogimon, C., Bendahmane, A., Chovelon, V., Biossot, N. (2010). Host plant resistance to aphids incultivated crops: Genetic and molecular bases, and interactions with aphid populations. *C, R, biologies*, 333, 566-573.
- [66]. Mascarin, G. M., Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as microbial insecticide. *World J Microbiol Biotechnol*, 32(11), 177. doi: 10.1007/s11274-016-2131-3.
- [67]. Sabbahi, R. (2008). Utilisation du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* dans une stratégie de gestion phytosanitaire des principaux insectes ravageurs en fraiseriaies. Thèse. Québec, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique, Doctorat en biologie, 162 p.
- [68]. Thakore, Y. (2006). The biopesticide market for global agriculture use. *Ind.Biotechnol.*, 2, p,194-208.
- [69]. McGinnis, M. R., Tying, S. K. (1996). Introduction to Mycology. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
- [70]. Goh, T.K., Hyde, K.D. (1996). Biodiversity of freshwater fungi. *J Ind. Microbiol*, 17, 328-345.
- [71]. Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res*, 105, 1422-1432.

- [72]. Carruthers, R and Soper, R. (1987). Fungal diseases. In: Fuxa, J. R. and Tanada, Y. (eds), *Epizootiology of Insect Diseases*. Wiley-Interscience, New York, pp, 357-416.
- [73]. Wreight, R. J. & Roberts, D., 1987-Insect control effort with fungi. *Developments in industrial microbiology* 28, p, 77-87.
- [74]. Goettel, M.S and Inglis, G.D. (1997). (Eds.) *Fungi: Hyphomycetes*. Intercept Limited.
- [75]. White, M. M., James, T. Y., O'Donnell, K., Cafaro, M. J., Tanabe, Y., & Sugiyama, J. (2006). Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia*, 98, 872-884.
- [76]. Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Thorsten-Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J.W, Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y. C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Kõljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K. H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J. M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V, Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schüssler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao Y. J., Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*, 111(5), 509-47. doi: 10.1016/j.mycres.2007.03.004.
- [77]. James, T. Y., Letcher, P. M., Longcore, J. E., Mozley-Standridge, S. E., Porter, D., Powell, M. J., Griffith, G. W., Vilgalys, R. (2006). A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia*, 98(6), 860-71. doi: 10.3852/mycologia.98.6.860.
- [78]. Vega, F. E., Dowd, P. F. (2005). The role of yeasts as insect endosymbionts. In: Vega FE, Blackwell M, editors. *Insect-Fungal Associations : ecology and evolution*. Oxford University Press; New York. pp. 211-243.
- [79]. Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. (2011). *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier, Amsterdam.
- [80]. Meyling, N. V., Eilenberg J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43, 145-155.
- [81]. Ekesi, S., Dimbi, S., Maniania., N. (2007). The Role of Entomopathogenic fungi in the Integrated Management of Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) with Emphasis on Species Occurring in Africa. *Research SignPost. Kerala. India*, 37, 239-274.
- [82]. Margy-Alejandra, E. M., Alzimiro-Marcelo, C. C., Marcelo, E. F. (2017). Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Arq. Inst. Biol*, (84), 1-10.
- [83]. Pedrini, N., Crespo, R., Juarez, M. P. (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol*, 146, 124-137.

- [84]. Vega, F.E., Blackwell, M. (2005). *Ecology and Evolution*. (Eds.), *Insect-Fungal Associations*: (pp. 191-210). Oxford University Press.
- [85]. Altinok, H. H., Altinok, M.A., Koca, A.S. (2019). MODES OF ACTION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI. *Current Trends in Natural Sciences*, 8(16), 117-124.
- [86]. Wang, H., Peng, H., Li, W., Cheng, P., Gong, M. (2021). The toxins of *Beauveria bassiana* and the strategies to improve their virulence to insects. *Front. Microbiol*, 12(705343), 1-11. doi: 10.3389/fmicb.2021.705343.
- [87]. Gurulingappa, P., Sword, G. Murdoch G., McGee, P. A. (2010). Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. *Biol Control*, 55, 34-41.
- [88]. Samson, R.A., Evans, H.C., Latgé, J.P. (2013). Atlas of Entomopathogenic fungi; Springer Science & Business Media: Berlin, Germany.
- [89]. Braga, G. U. L., Flint, S. D., Messias, C. L., Anderson, A. J., Roberts, D. W. (2001). Effects of uv-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycol Res*, 105, 874-882.
- [90]. Inglis, G. D., Goettel, M. S, Butt T.M., Strasser, H. (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds) *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 23-55.
- [91]. Silvy, C and Riba, G. (1989). Biopesticides contre maladies, insectes, mauvaise herbe. *Dossier de l'environnement*, N° J 9, pp, 157-20.
- [92]. Ekesi, S., Maniania, N. K., Ampong-nyarko K. (1999). Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Biocontrol Sci and Technol*, 9, 177-185.
- [93]. Fargues, J et Luz, C. (2000). Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Rhodnius prolixus*. *Biocontrol Sci Technol*, 8, 323-334.
- [94]. Mitsuaki, S. (2004). Effect of temperature on growth of *Beauveria bassiana* F-263, a strain highly virulent to the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*, especially tolerance to high temperatures. *Appl Entomol Zool*, 39, 469-475.
- [95]. Hallsworth, J. F et Magan, K. E. (1999). Hallsworth and N. Magan, Water and temperature relations of growth of three entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*, *J. Invertebr. Pathol*, 261-266.
- [96]. Hastuti, B. S., Glare, T. R., Chapman R. B. (1999). Effect of temperature and humidity on the susceptibility of *Parosis cltarybdis* to *Beauveria bassiana*. *Proc. 52nd N.Z. Plant Protection Conf*, 103-107.
- [97]. Soza-Gómez, D. R et Alves, S. B. (2000). Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Monillicae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* (english version), 29, 515-521.
- [98]. Liu, B. L and Tzeng, Y. M. (1999). Water content and water activity for the production of cyclodepsipeptides in solid-state fermentation by *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnol Lett*. 21, 657-661.

- [99]. Keller, S and Zimmermann, G. J. (1989). Mycopathogens of soil insects. In Wilding, N., N. Collins, N. M. Hammond, P. M. Webber, and I. F. Webber (eds.), *Insect-Fungus Interactions*. Academic Press, London, p, 240-269.
- [100]. McCoy, A., Quintela, E. D et Faria M. (1990). Environmental Persistence of Entomopathogenic Fungi. In, New direction in biological control. R. R. Baker and P. E. Dunn (eds), A. R. Liss, New York, 139-159.
- [101]. Groden, E and Lockwood, J. L. (1991). Effects of soil fungistasis on *Beauveria bassiana* and its relationship to disease incidence in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, in Michigan and Rhode Island soils. *J. Invertebr. Pathol*, 57, 7-76.
- [102]. Meyling, N. V and Eilenberg J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation *boil. Contr*, 43, 145-155.
- [103]. Cohn, F. (1870). Untersuchungen über Bacterien. *Beitrage zur Biologie der Pflanzen. Heft*, 2, 127-224.
- [104]. Starnes, R. L., Sparks, M. E., Sparks, W. S. (1993). Potential of Entomopathogenic Bacteria in Biological Control. *Florida Entomologist*, 76(2), 170-179.
- [105]. Woese, C. R., Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A. Nov*, 74(11), 5088-5090. doi: 10.1073/pnas.74.11.5088.
- [106]. Surya, S., Prakash, S., Upendra, T. S., Namita, P., Om-Prakash, D. (2016). Bacteriological Profile and Antibiotic Susceptibility Pattern of Blood Culture Isolates from Patients Visiting Janamaitri Hospital, Balaju, Kathmandu, Nepal. *Global Journal of Medical Research*, 16(C1), 25-31.
- [107]. Kalha, C. S., Singh, P. P., Kang S. S., Hunjan M. S., Gupta, V., Sharma, R., Chapter 12 - Entomopathogenic Viruses and Bacteria for Insect-Pest Control. (2014). Editor(s): Dharam P. *Abrol, Integrated Pest Management*, Academic Press, 225-244.
- [108]. Betz, F. S., Hammond, B. G., & Fuchs, R. L. (2000). Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 32(2), 156-173. <https://doi.org/10.1006/rtp.2000.1426>
- [109]. Villamizar, S., Ferro, J. A., Caicedo, J. C., Alves, L. M. C. (2020). Bactericidal Effect of Entomopathogenic Bacterium *Pseudomonas entomophila* Against *Xanthomonas citri* Reduces Citrus Canker Disease Severity. *Front. Microbiol*, 11, 1431. doi: 10.3389/fmicb.2020.01431
- [110]. Vallet-Gely, I., Lemaitre, B., Bocard, F. (2008). Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nat Rev Microbiol*, 6(4), 302-13. doi: 10.1038/nrmicro1870. Epub 2008 Mar 10. PMID: 18327270
- [111]. Irsad., Shahid, M., Haq, E., Mohamed, A., Rizvi, P. Q., Kolanthasamy, E. (2023). Entomopathogen-based biopesticides: insights into unraveling their potential in insect pest management. *Front. Microbiol*, 14, 1-24. doi:10.3389/fmicb.2023.1208237

- [112]. Bravo, A., Gill, S. S., Soberon, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423-435, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>.
- [113]. Palma, L., Munoz, D., Berry, C., Murillo, J., Caballero, P. (2014). Draft genome sequences of two *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a putative 41.9-kDa insecticidal toxin. *Toxins*, 6(5),1490-1504. <https://doi.org/10.3390/toxins6051490>.
- [114]. Choma, C.T., Surewicz, W.K., Kaplan, H. (1991). The toxic moiety of the *Bacillus thuringiensis* protoxin undergoes a conformational change upon activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 179, 933-938.
- [115]. Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J. L., Brousseau, R., Cygler, M. (1995). *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol*, 254(3), 447-64.
- [116]. Höfte, H., Whiteley, H. R., (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev*, 53, 242-255. <https://doi.org/10.1128/mr.53.2.242-255.1989>.
- [117]. Adang, Michael J., Staver, Michael J., Rocheleau, T. A., Leighton, J., Barker R. F., Thompson., David V. (1985). Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene*, 36(3), 289-300. doi:10.1016/0378-1119(85)90184-2.
- [118]. Opota, O., Vallet-Gély, I., Vincentelli, R., Kellenberger, C., Iacovache, I., Gonzalez, M. R., Roussel, A., van der Goot, F. G., & Lemaitre, B. (2011). Monalysin, a novel β -pore-forming toxin from the *Drosophila* pathogen *Pseudomonas entomophila*, contributes to host intestinal damage and lethality. *PLoS, pathogens*, 7(9), e1002259. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002259>.
- [119]. Whitchurch, C. B., Erova, T. E., Emery, J. A., Sargent, J. L., Harris, J. M., Semmler, A. B., Young M. D., Mattick, J. S., Wozniak, D. J. (2002). Phosphorylation of the *Pseudomonas aeruginosa* response regulator AlgR is essential for type IV fimbria-mediated twitching motility. *J Bacteriol*,184:4544-4554.
- [120]. Ramos, J.L., Goldberg, J.B., Filloux, A. (2015). *Pseudomonas* || *Pseudomonas entomophila*: A Versatile Bacterium with Entomopathogenic Properties. 5(Chapter 2), 25-49. doi:10.1007/978-94-017-9555-52.
- [121]. Péchy-Tarr, M., Bruck, D. J., Mau-rhofer, M., Fischer, E., Vogne, C., Henkels, M. D., Donahue, M. K., Grunder, J., Loper, J. E., Christoph, K. (2008). Molecular analysis of a novel gene cluster encoding an insect toxin in plant-associated strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Environ Micro- biol*, 10(9), 2368-2386. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01662.x>
- [122]. Ruffner, B., Pechy-Tarr, M., Ryffel, F., Hoegger, P., Obrist, C., Rindlisbacher, A, Keel, C., Maurhofer, M. (2013). Oral insecticidal activity of plant-associated pseudomonads. *Environ Microbiol*, 15(3), 751-763. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02884.x>.
- [123]. Vodovar, N., Vallenet, D., Cruveiller, S., Rouy, Z., Barbe, V., Acosta, C., Cattolico, L., Jubin, C., Lajus, A., Segurens, B. (2006). Complete genome sequence of the

- entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nat Biotechnol*, 24, 673-679.
- [124]. Waterfield, N. R., Hares, M., Yang, G., Dowling, A. J., Ffrench-Constant, R. H. (2005). Potentiation and cellular phenotypes of the insecticidal toxin complexes of *Photorhabdus* bacteria. *Cell Microbiol*, 7(3), 373-382. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00467.x.
- [125]. Bayissa, W., Abera, A., Temesgen, J., Abera, G., Mendesil, E. (2023). Organic soil fertility management practices for the management of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), in maize. *Front Insect Sci.* 3, 1-26. doi: 10.3389/finsc.2023.1210719.
- [126]. Wraight, S. P., Filotas M.J., Sanderson, J. P. (2016). Comparative efficacy of emulsifiable oil wettable powder and unformulated powder preparations of *Beauveria bassiana* against the melon aphid *Aphis gossypii*. *Biocontrol Science and Technology*, 26(7), 894-914. <https://doi.org/10.1080/09583157.2016.1157851>
- [127]. Mazid, S., Kalita, J. C., Rajkhowa, R. C. (2011). A review on the use of biopesticides in insect pest management. *International Journal of Science and Advanced Technology*, 1(7), 169-178. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-4244-2>.
- [128]. Lacey, L.A., Grzywacz D., Shapiro-Ilan D. I., Frutos R., Brownbridge M., Goettel M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 1-41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>.
- [129]. Ravensberg, W.J. (2011). A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods. (Springer, Ed.). New York, Etats Unis, p.400.
- [130]. Samuels, R.I., Coracini, D.L.A., Santos, C.A.M. Gava, C.A.T. (2002). Infection of *Blissus antillus* (Hemiptera: Lygaeidae) eggs by the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Biol. Control*, 23 (3), 269-273.
- [131]. Ferreira, J.F., Marques, e.J., Marquês, I.M.R., Oliveira, J.V. Santos-Junior, H.J.G. (2005) Efeito de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre ovos d'*Alabama argillacea* (Huebner.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Magistra*, 17 (3), 19-123.
- [132]. Feng, M. G., Poprawski, T. J., Khachatourians, G. G. (1994). Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology*, 4, 3-34.
- [133]. Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J., Grant, W. P (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society channel formation. J. Mol. Biol*, 254(3), 447-64.
- [134]. Meyling, N. V., Lübeck, M., Buckley, E. P. Eilenberg, J. Rehner, S.A. (2009). Community composition, host range and genetic structure of the fungal Entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Mol ecol*, 18, 1282-1293.
- [135]. Todorova, S. I., Coderre, D., Côté, I. C., Vincent E. (2002). Screening of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) isolates against *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera : Tortricidae). *Cand. Entomol*, 134, 77-84.

- [136]. Halling, J. L., Wraight, S. P Miller, R. M. (2004). Efficacy of *Blaeuferia bassiana* (Hyphomycetes) for Control of russian wheat aphid (Homoptera: Aphidae) on resistant wheat under field condition. *Biol, Sc, Technol*, 14, 459-473.
- [137]. Cloutier, C., Cloutier, C. (1992). Les solutions biologiques de lutte pour la répression des insectes et acariens ravageurs des cultures. In C. Vincent & D. Coderre : La lutte biologique. Gaëtan Morin, Québec, pp 19-88.
- [138]. Oulebsir-Mohandkaci, H., Doumandji-Mitiche, B., Behidj, N. (2012). Etude de l'impact biologique de *Pseudomonas spp. fluorescents* sur les métabolites hémolympatiques et l'histologie du tube digestif des larves L5 du criquets migrateur *Locusta Migratoria* (Linné, 1758). *Lebanese Science Journal*, 13(2), 99-115.
- [139]. Lydie, S. (2010). La lutte biologique. Éditions Quae. (1^{er} édition). pp : 328. Versailles, France.
- [140]. Brossard, H et Terry, O. (1984). Bactériologie systématique. C.R.D.P, Lyon, 220p.
- [141]. Lacey, L. A and Goettel, M. (1995). Current Development in Microbial Control of Insect Pests and Prospects for Early 21st Century. *Entomophaga*, 40 (I), 3-27.
- [142]. Mazid, S., Kalita, J. C., Rajkhowa, R. C. (2011). A review on the use of biopesticides in insect pest management. International Journal of Science and Advanced Technology, 1(7), 169-178. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-4244-2>.
- [143]. Tanada, Y. (1959). Microbial Control of Insect Pests. Annual Review of Entomology,4: 277-302. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.04.010159.001425>.
- [144]. Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., Van-Loon, L.C. (2007). Induced systemic Resistance by fluorescent *Pseudomonas spp.* *Phytopathology*, 97 (2), 239-243.
- [145]. Oulebsir-Mohandkaci, H., Doumandji-Mitiche, B., Behidj, N., (2015). Evaluation de la toxicité de *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus sphaericus* à l'égard du criquet migrateur *Locusta migratoria* (Linné, 1758). *Revue Nature & Technologie*, 12(1), 100-109.
- [146]. Someya, N., Tsuchiya, K., Yoshida, T., Noguchi, M. T., Sawada, H. (2007). Encapsulation of cabbage seeds in alginate polymer containing the biocontrol Bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain LRB3W1 for the control of cabbage Soilborne diseases. *Seed Sci. Technol*, 35, 371-379.
- [147]. Srivastava, A.K., Singh, T., Jana, T.K., Arora, D.K. (2001). Induced resistance and Control of charcoal rot in Cicer arietinum (chickpea) by *Pseudomonas fluorescens*. *Rev. Can. Bot*, 79, 787-795.
- [148]. Weller, D.M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking Back over 30 years. *Phytopathology*, 97, 250-256.
- [149]. Colombo, A. (2004). La culture des agrumes. Vecchi.S.A.Parie. ISBN 10 : 2732813591 ISBN 13 : 9782732813592 P 1-5-98-94.
- [150]. Benaissat, F.Z. (2015). La caractérisation de la sensibilité des variétés d'agrumes aux pourritures en post-récolte. Mémoire de master d'université. Fès. 61p.
- [151]. MAPM (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime).2013. Note de veille secteur agrumicole ; Note stratégique n°97

- [152]. MADR (La Ministre de l'Agriculture et du développement du Rural). (2009). La direction des statistiques Agricoles et des systèmes d'information. MADR. Algérie.
- [153]. Loucif, Z., Bounafonte, P. (1977). Observation des populations du Pou de Saint José *Quadraspidiotus perniciosus* Comst. (Hom. Diaspididae) dans la plaine de la Mitidja (Algérie) d'octobre 1975 à mai 1976. *Revue fruit*, 32 (4), 253-261.
- [154]. Jansson, J. K., Hofmockel, K. S. (2020). Soil microbiomes and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, 18(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0265-7>
- [155]. Jayanthi, B., Emenike, C. U., Agamuthu, P., Simarani, K., Mohamad, S., Fauziah, S. H. (2016). Selected microbial diversity of contaminated landfill soil of Peninsular Malaysia and the behavior towards heavy metal exposure. *Catena*, 147, 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2016.06.033>
- [156]. Goettel, M. S and Inglis, G.D. (1997). (Eds.) Fungi: Hyphomycetes. Intercept Limited.
- [157]. Lakhdari, A., Doumandji-Mitich, B., Dahliz, A. (2015). Essai de lutte biologique contre *Brachytrupes megacephalus* Lefebvre, 1827 (Orthoptera, Gryllinae) par l'utilisation des champignons entomopathogènes. *Revue des BioRessources*, 5(1), 37-49.
- [158]. Hurpin and Vago (1958). Les maladies du hanneton commun melolontha L. (col. Scarabeidal). *Entomophaga*, 3(1958), pp.285-330.
- [159]. Botton, B. Breton, A., Fevre, M., Gauthir, S., Guy, P.H., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y., Veau, P. (1990). Moississures utiles et nuisible importance industrielle. 2éme édition. maosson collection biotechnologies . p.34-42.
- [160]. Messiaen, C.M., Blancard, D., Rouxel, F., Lafon, R. (1991). Les maladies des plantes maraichères. INRAA, Paris.
- [161]. Rémi C. (1997). Identifier les champignons transmis par les semences. INRA, Paris.
- [162]. Hoggard, M., Vesty, A., Wong, G., Montgomery, J. M., Fourie, C., Douglas, R. G., Taylor M.W. (2018). Characterizing the human mycobiota: a comparison of small subunit rRNA, ITS1, ITS2, and large subunit rRNA genomic targets. *Frontiers in microbiology*, 1-9.
- [163]. GARDES, M and BRUNS, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113-118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>.
- [164]. Carbone, I and Kohn, L.M. (1999). A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553-556. <https://doi.org/10.2307/3761358>.
- [165]. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.
- [166]. Butt, T.M and Goettel, M.S. (2000). Bioassays of entomopathogenic microbes and Nematodes. K.R.S.CABI Publishing, New York, 320p.

- [167]. Guesmi-Jouini, J., Boughalleb-M'hamdi, N., Ben-Halima, K.M. (2011). Etudes préliminaires sur les champignons entomopathogènes des pucerons de l'artichaut en Tunisie. *Faunistic Entomology*, 63(3), 171-181.
- [168]. Bikream, N., Shrestha J., Bhattarai S. (2018). Identification of *Pseudomonas fluorescens* using different biochemical tests. *International Journal of Applied Biology*, 2(2), 27-32. <https://doi.org/10.20956/ijab.v2i2.5260>.
- [169]. Rabha, M., Sharma, S., Acharjee, S., & Sarmah, B. K. (2017). Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains native to Assam soil of North East India. *3 Biotech*, 7(5), 303. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0935-y>
- [170]. Zeleke, W., Tenssay, M.A., Alexander, E., Bentilson, S. (2009). Isolation and Characterization of *Bacillus Thuringiensis* from soils in contrasting agroecological zones of Ethiopia. *Biology, Sinet Ethiopian Journal of Science*, 32(2).
- [171]. Guiraud, J.P (2003). Microbiologie alimentaire ; Application à l'étude des principaux groupes microbiens .Ed.DUNDD. 651P.
- [172]. Holt, J.G (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (9th edn. Williams and Wilkins). Baltimore, USA.
- [173]. Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., Böttger, E.C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*, 17(19), 7843-7853. <https://doi.org/10.1093/nar/17.19.7843>.
- [174]. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J, Mol, Biol*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- [175]. Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- [176]. Karungu, S., Huang, D., Atoni, E., Waruhiu, C., Agwanda, B., Hu, X., Yuan, Z. (2018). Isolation, identification and evaluation of mosquito entomopathogenic *Bacillus* species and related genera from randomly selected sites in Kenya. *African Journal of Microbiology Research*, 12(12), 290-299. <https://doi.org/10.5897/AJMR2018.8824>.
- [177]. Bru, J.P., Caron, F., Cattoen, C., Cattoir, V., Dubreuil, L., Lina, G., Merens, A., Plesiat, P., Ploy, M.C., Soussy, C.J., Varon, E., 2020 - Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. V.1.1 Avril
- [178]. Agbe, H., Sarkar, D.K., Chen, X.G. (2020). Tunable Superhydrophobic Aluminum Surfaces with Anti-Biofouling and Antibacterial Properties. *Coatings*, 10(10), 1-10. <https://doi.org/10.3390/coatings10100982>.
- [179]. Oulebsir-Mohandkaci, H., Khemili-Talbi, S., Benzina, F., Halouane, F. (2015). Isolation and of Entomopathogenic Bacteria from Algerian Desert Soil and their Effects against the Migratory Locust, *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758) (Orthoptera: Acrididae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 25(3), 739-746.
- [180]. Abbot, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol*, 18, 265–267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>.

- [181]. Finney, D.J (1971) Probit Analysis. (3rd edn. Wiley). Cambridge University Press, UK.
- [182]. Saruhan, I. (2018). Efficacy of some entomopathogenic fungi against *Aphis fabae* Scopoli (Hemiptera: Aphididae). *Egypt J Biol Pest Control*, 28(89), 1-6.
<https://doi.org/10.1186/s41938-018-0096-2>
- [183]. Lone, S.A., Malik, A., Padaria, J.C. (2017). Selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from northwestern Himalayas toxic against *Helicoverpa armigera*. *Microbiologyopen*, 6(6), 1-11. <https://doi.org/10.1002/mbo3.484>
- [184]. Ravishankar, N., Vaishali, P., Deepika, S. (2015) In vitro Biofilm Formation of *Pseudomonas fluorescens*, A Promising Technique for Waste Water Treatment. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 4(2), 1602-1606.
- [185]. Guiraud, J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, 652p.
- [186]. Singleton, P and Sainsbury, D. (2006). Dictionary of microbiology and molecular biology, Third Edition Paul Singleton and Diana Sainsbury. John Wiley and Sons Ltd. ISBN. Pp, 637-638.
- [187]. González, A., Díaz, R., Díaz, M., Borrero, Y., Bruzón, R.Y., Carreras, B., Gato, R. (2011). Characterization of *Bacillus thuringiensis* soil isolates from Cuba, with insecticidal activity against mosquitoes. *Int J Trop Biol*, 59(3), 1007-1016.
<https://doi.org/10.15517/rbt.v0i0.3374>.
- [188]. Suman B., Gopal A.V., Reddy R.S., Triveni S. (2015). Isolation and characterization of native pseudomonas fluorescens isolate from rangareddy district in Telangana state. *Int J Microbiol Res Rev*, 5(1), 164-169.
- [189]. Rodríguez, M., Marín, A., Torres, M., Béjar, V., Campos, M., Sampedro. (2018). Aphicidal Activity of Surfactants Produced by *Bacillus atrophaeus* L193. *Front, Microbiol*, 9(3114), 1-12. doi : 10.3389/fmicb.2018.03114.
- [190]. Kain, C.G., Ache, T.N., Katamssadan, T.H., Kinge, T.R. (2024). Identification and phylogenetic relationship of fungi species associated with potato aphids in Bamenda, Northwest Region of Cameroon. *Journal of Applied Biosciences*, (198), 20942 – 20962.
<https://doi.org/10.35759/JABs.198.5>.
- [191]. Hibbett, D.S., Ohman, A., Glotzer, D., Nuhn, M., Kirk, P., Nilsson, R.H. (2011). Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews*, 25(1), 38-47.
- [192]. Raja, H.A., Miller, A.N., Pearce, C.J., Oberlies, N.H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, (80), 756-770.
- [193]. Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W. (2012). Fungal Barcoding Consortium; Fungal Barcoding Consortium Author List. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(16), 6241-6.
- [194]. Al-Keridis, L.H. (2015). Application of *Penicillium sp* as Entomopathogenic Fungi to Control the Red Rust Beetle *Tribolium castaneum* (Hbst.) (Coleoptera:Tenebrionidae). *Biosci. Biotech. Res. Asia*, (12), 07-12. <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/2165>.

- [195]. Ragavendran, C., Srinivasan, R., Kim, M., Natarajan, D. (2018). *Aspergillus terreus* (Trichocomaceae): A Natural, Eco-Friendly Mycoinsecticide for Control of Malaria, Filariasis, Dengue Vectors and Its Toxicity Assessment Against an Aquatic Model Organism *Artemia nauplii*. *Front, Pharmacol*, (9), 1-18. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2018.01355>.
- [196]. Isma'il, S., Deba, F.A., Ladan, M.A., Yakubu, M.N., Haruna, U.S., Aliyu, H.U., Abdulhameed A., Tahir F. (2023). In-vitro pathogenicity of *Akanthomyces lecanii* and *Metarhizium anisopliae* against the aphid *Aphis craccivora*. *Anales de Biologia*, (45), 97-106. <http://dx.doi.org/10.6018/analesbio.45.11>.
- [197]. Diaz, B.M., Oggerin, M., Lopez-Lastra, C.C., Rubio, V., Fereres, A. (2009). Characterization and virulence of *Lecanicillium lecanii* against different aphid species. *BioControl*, (54), 825-835. DOI:10.1007/s10526-009-9218-9.
- [198]. Ganassi, S., Grazioso, P., Moretti, A., Sabatini, M.A. (2010). Effects of the fungus *Lecanicillium lecanii* on survival. and reproduction of the aphid *Schizaphis graminum*. *BioControl*, (55), 299-312. DOI 10.1007/s10526-009-9250-9.
- [199]. Aqueel, M.A and Leather, S.R. (2012). Virulence of *Verticillium lecanii* (Z.) against cereal aphids; does timing of infection affect the performance of parasitoids and predators?. *Pest Manag Sci*, (69)4, 493-498. <https://doi.org/10.1002/ps.3398>.
- [200]. KIM, J.J. (2007). Influence of *Lecanicillium attenuatum* on the development and reproduction of the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *BioControl*, (52), 789-799. doi:10.1007/s10526-006-9050-4.
- [201]. Puspitarini, R.D., Fernando, I., Sianturi, Y.P.P.A., Rachmawati, R. (2021). Compatibility of *Jatropha curcas* seed extract and entomopathogenic fungus *Akanthomyces lecanii* against the citrus red mite *Panonychus citri*. *Biocontrol Science and Technology*, 32(3), 299-313. <https://doi.org/10.1080/09583157.2021.1993134>.
- [202]. Medina, J.D., Granada, D., Bedoya, J.C., Cardona, N. (2021). Production of *Akanthomyces lecanii* by submerged fermentation to control *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) in *Gerbera jamesonii* crops. *Biocontrol Science and Technology*, 31(12), 1377-1387. <https://doi.org/10.1080/09583157.2021.1953442>.
- [203]. Broumandnia, F., Rajabpour, A., Hamed Ghodoum-Parizipour, M., Yarahmadi, F. (2021). Morphological and molecular identification of four isolates of the entomopathogenic fungal genus *Akanthomyces* and their effects against *Bemisia tabaci* on cucumber. *Bulletin of Entomological Research*, 111(5), 628-636. doi:10.1017/S0007485321000298.
- [204]. Cindy, M and Carlos, E. (2022). In vitro versus in planta: Comparing the compatibility of *Akanthomyces lecanii* with pesticides against *Trialeurodes vaporariorum*. *Journal of Applied Entomology*, 146 (10), 1272-1280. <https://doi.org/10.1111/jen.13064>.
- [205]. Mohammed, A.A., Kadhim, J.H., Kamaluddin, A.N.A. (2018). Selection of highly virulent entomopathogenic fungal isolates to control the greenhouse aphid species in Iraq. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28 (71), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0079-3>.

- [206]. Shinde, S.V., Patel, K.G., Purohit, M.S., Pandya, J.R., Sabalpara, A.N (2010). *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare and Games, an important biocontrol agent for the management of insect pests, *A review, Agri Review*, (31), 235-252.
- [207]. Kanaoka, M.A., Isogai, S., Murakoshi, M., Ichione, A., Suzuki, A., Tamura, S. (1978). Bassionalide: A new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Agricultural and Biological Chemistry*, (42), 629-640.
- [208]. Soman, A.G., Gloer, J.B., Angawi, R.F., Wicklow, D.T., Dowd, P.F. (2001). Vertilecanins: New Phenopicolinic Acid Analogues from *Verticillium lecanii*. *Journal of Natural Products*, (64), 189-192.
- [209]. Mukherjee, A., Debnath, P., Ghosh, S.K., Medda, P.K. (2019). Biological control of papaya aphid (*Aphis gossypii* Glover) using entomopathogenic fungi. *Vegetos*, (33), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s42535-019-00072-x>.
- [210]. Pacheco, J.C., Poltronieri, A.S., Porsani, M.V., Zawadneak, M.A.C., Pimentel, I.C. (2017). Entomopathogenic potential of fungi isolated from intertidal environments against the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: aphididae). *Biocontrol Science and Technology*, 27(4), 496-509. <https://doi.org/10.1080/09583157.2017.1315053>
- [211]. Al-Shindah, R.S.D., Hassan, A.A., Mansour, M.S. (2022). Isolation and Identification of Entomopathogenic Fungi from of Green Peach Aphid *Myzus Persicae* and Evaluation of Their Activity for Insect Control. IOP Conf. Ser. *Earth Environ. Sci*, 1060(012093), 1-13. doi:10.1088/1755-1315/1060/1/012093.
- [212]. Helen, Y., Pell, J.K., Alderson, P.G., Clark, S.J., Pye, B.J. (2003). Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. *Pest Manag Sci*, (59), 156-165.
- [213]. Long, D.W., Drummond, G.A., Groden, E. (2000). Horizontal transmission of *Beauveria bassiana*. *Agri Forest Ento*, (2), 11-17.
- [214]. Shahid, A.A., Rao, A., Bakhsh, A., Husnain, T. (2012). Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, (64), 21- 42.
- [215]. St Leger, R.J. (1993). Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by deuteromycete fungal pathogens, In: Parasites and pathogens of insects. BeckageNE, ThompsonSN, (eds), Federici BA (eds.). Academic Press Inc., New York, USA .2, 211-225.
- [216]. Abdel-Galil, F.A., Moharram, A.M., Mahmoud, M.A., Hafez, W.M.H. (2019). Biocontrol of Bean and Wheat Aphids by Fungi Isolated from Indigenous and Invasive Insects Collected from Different Locations in Minia Governorate. Egypt. *Acad. J. Biolog. Sci*, 11(3), 79-90.
- [217]. Ragavendran, C and Natarajan, D. (2015). Insecticidal potency of *Aspergillus terreus* against larvae and pupae of three mosquito species *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*, and *Aedes aegypti*. *Environ Sci Pollut Res*, (22), 17224-7237. DOI 10.1007/s11356-015-4961-1.

- [218]. Khalid, S., Mahmood, N., Ali, A., Abrar, A. (2019). Evaluation of *Aspergillus terreus* as potential biological control agent of the dengue mosquito (*Aedes aegypti*). *Mycopath*, 17(1), 21-28.
- [219]. Nasidi, A., Nafisa, A.A., Maryam, S.K., Salihu, I.I., Umar, G.N., Muhammad, A., Umar, K.M., Bala, M., Imam, A.A. (2019). Larvicidal potential of *Aspergillus terreus* conidial suspension and metabolites against anopheles mosquito. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 7(4), 1169-1173.
- [220]. Daniel, J.F.S., Silva, A.A., Nakagawa, D.H., Tavares, L.J., Abreu, L.M., Rodrigues-filho E. (2017). Larvicidal Activity of *Beauveria bassiana* Extracts against *Aedes aegypti* and Identification of Beauvericins, *J Braz. Chem. Soc*, 28(6), 1003-1013.
- [221]. Vu, V.H., Hong, S.I., Kim, K. (2007). Selection of entomopathogenic fungi for aphid control. *J Biosci Bioeng*, 104(6), 498-505. doi:10.1263/jbb.104.498. PMID: 18215637.
- [222]. Meddase, S., Oulebsir-Mohandkaci, H., Hadjouti, R., Reghmit, N., Houas, Y., Amirat, D., Nait-Bouda, L., Doumandji-Mitiche, B. (2020). Caractérisation des *Bacillus spp.* Isolées du sol d'olivier et étude de leurs potentialités de biocontrôle contre la mouche d'olivier *Dacus oleae* (Gmel) au nord de l'Algérie. *Agrobiologia*, 10(1), 1872-1882.
- [223]. West, A.W., Burges, H.D., Dixon, T.J. (1985). Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore inocula in soil: Effects of pH, moisture, nutrient availability and indigenous microorganisms. *Soil, Biol Biochem*, 17(5), 657-665. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(85\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(85)90043-4).
- [224]. Bahar, A.A and Demirbag, Z. (2007). Isolation of pathogenic bacteria from *Oberea linearis* (Coleptera: Cerambycidae). *Biologia Bratislava*, 62(1), 13-18. <https://doi.org/10.2478/s11756-007-0009-4>.
- [225]. Astuti, D.T., Pujiastuti, Y., Suparman, SHK., Damiri, N., Nugraha, S., Sembiring, E.R., Mulawarman. (2018). Exploration of *Bacillus thuringiensis* Berl. from soil and screening test its toxicity on insects of Lepidoptera order. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*, 102, 1-7. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/102/1/012063>.
- [226]. Manasa, K., Subhash-Reddy, R., Triveni, S. (2017). Isolation and characterisation of *Pseudomonas fluorescens* isolates from different rhizosphere soils of Telangana. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(3), 224-229.
- [227]. Falcone, N., She, Z., Chen, C., Dong, B., Yie, D., Kraatz, H.B. (2017). Demonstration of a tailorable and PCR-free detection of *Enterococcus* DNA isolated from soil samples. *Anal Methods*, (10), 1-7. DOI: 10.1039/c6ay03309a.
- [228]. García-Solache, M., Rice, L.B. (2019). The *Enterococcus*: a Model of Adaptability to Its Environment. *Clin Microbiol Rev*, 32(2), 1-28. <https://doi.org/10.1128/cmr.00058-18>.
- [229]. Fisher, K., Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *M cryobiology*, 155(6), 1749-757. <https://doi.org/10.1099/mic.0.026385-0>.
- [230]. Franz, C.M., Holzappel, W.H., Stiles, M.E. (1999). *Enterococci* at the crossroads of food safety?. *Int J Food Microbiol*, 47(1-2), 1-24. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00007-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00007-0).

- [231]. Hiebert, N., Kessel, T., Skaljic, M., Spohn, M., Vilcinskas, A., Lee, K.Z. (2020). The Gram-Positive Bacterium *Leuconostoc pseudomesenteroides* Shows Insecticidal Activity against Drosophilid and Aphid Pests. *Insects*, 11(8), 471. doi: 10.3390/insects11080471.
- [232]. Wang, S.L., Lin, B.S., Liang, T.W., Wang, C.L., Wu, P.C., Liu, J.R. (2010). Purification and characterization of chitinase from a new species strain, *Pseudomonas* sp. TKU008. *J Microbiol Biotechnol*, 20(6), 1001-1005.
- [233]. Porcar, M., Grenier, A.M., Federici, B., Rahbe, Y. (2009). Effects of *Bacillus thuringiensis* α -Endotoxins on the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Appl Environ Microbiol*, 75(14), 4897-4900. <https://doi.org/10.1128/AEM.00686-09>.
- [234]. Baazeem, A., Alotaibi, S.S., Khalaf, L.K., Kumar, U., Zaynab M., Alharthi, S., Darwish, H., Alghamdi, A., Jat, S.K., Al-Barty, A., Albogami, B., Noureldeen, A., Ravindran, B. (2022). Identification and environment-friendly biocontrol potential of five different bacteria against *Aphis punicae* and *Aphis illinoisensis* (Hemiptera: Aphididae). *Front Microbiol*, 13, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.961349>.
- [235]. Paliwal, D., Hamilton, A.J., Barrett, G.A., Alberti, F., Van-Emden, H., Monteil, C.L., Mauchline, T.H., Nauen, R., Wagstaff, C., Bass, C., Jackson, R.W. (2022). Identification of novel aphid-killing bacteria to protect plants. *Microb Biotechnol*, 15(4), 1203–1220. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13902>.
- [236]. Pujiastuti, Y., Indriani, E., Muslim, A., Irsan, C., Arsi, A. (2021). Effectivity of *Bacillus thuringiensis* from Soil in Freshwater Swamps against *Epilachna* sp. Larvae. *Journal of Suboptimal Lands*, 10(1), 46-53. <https://doi.org/10.36706/JLSO.10.1.2021.531>.
- [237]. Elsharkawy, M.M., Almasoud, M., Alsulaiman, Y.M., Baeshen, R.S., Elshazly, H., Kadi, R.H., Hassan, M.M., Shaver, R. (2022). Efficiency of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* against *Rhynchophorus ferrugineus*. *Insects*, 13(905), 1-12. <https://doi.org/10.3390/insects13100905>.
- [238]. Lukasova, J and Sustackova, A. (2003). *Enterococci* and antibiotic resistance. *Acta Vet Brno*, 72(2), 315-323. <https://doi.org/10.2754/avb200372020315>.
- [239]. Xiang, H., Wei, G.F., Jia, S., Huang, J., Miao, X.X., Zhou, Z., Zhao, L.P., Huang, Y.P. (2006). Microbial communities in the larval midgut of laboratory and field populations of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Can J Microbiol*, 52(11), 1085-1092. <https://doi.org/10.1139/w06-064>.
- [240]. Cox, C.R and Gilmore, M.S. (2007). Native Microbial Colonization of *Drosophila melanogaster* and Its Use as a Model of *Enterococcus faecalis* Pathogenesis. *Infect Immun*, 75(4), 1565-1576. <https://doi.org/10.1128/IAI.01496-06>.
- [241]. Mason, K.L., Stepien, T.A., Blum, J.E., Holt, J.F., Labbe, N.H., Rush, J.S., Raffa, K.F., Handelsman J. (2011). From Commensal to Pathogen: Translocation of *Enterococcus faecalis* from the Midgut to the Hemocoel of *Manduca sexta*. *mBio*, 2(3), 1-7. <https://doi.org/10.1128/mbio.00065-11>.
- [242]. Sevim, A., Demirbag, Z., Demir, I. (2010). A new study on the bacteria of *Agrotis segetum* Schiff. (Lepidoptera: Noctuidae) and their insecticidal activities. *Turk J Agric For*, 34(4), 333-342. <https://doi.org/10.3906/tar-0902-9>.

- [243]. Sikorowski, P.P., Lawrence, A.M. (1994). Microbial contamination and insect rearing. *Am Entomol*, 40(4), 240-53. <https://doi.org/10.1093/ae/40.4.240>.
- [244]. Broderick, N.A., Robinson, C.J., McMahon, MD., Holt, J., Handelsman, J., Raffa, K.F. (2009). Contributions of gut bacteria to *Bacillus thuringiensis*-induced mortality vary across a range of Lepidoptera. *BMC Biol*, 7(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-11>.
- [245]. Wen, L., Ley, R.E., Volchkov, P.Y., Stranges, P.B., Avanesyan, L., Stonebraker, A.C., Hu, C., Wong F.S., Szot., G.L., Bluestone J.A., Gordon J.I., Chervonsky A.V. (2008). Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type1 diabetes. *Nature*, 455(7216), 1109-1113. <https://doi.org/10.1038/nature07336>.
- [246]. Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I. (2006). Anobesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027-1031. <https://doi.org/10.1038/nature05414>.
- [247]. Vijay-Kumar, M., Aitken, J.D., Carvalho, F.A., Cullender, T.C., Mwangi, S., Srinivasan, S., Sitaraman, S.V., Knight, R., Ley, R.E., Gewirtz, A.T. (2010). Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor5. *Science*, 328(5975), 228-231. <https://doi.org/10.1126/science.1179721>.
- [248]. Garrett, W.S., Gallini, C.A., Yatsunenkov, T., Michaud, M., DuBois, A., Delaney, M.L., Punit, S., Karlsson, M., Bry, L., Glickman, J.N., Gordon, J.I., Onderdonk, A.B., Glimcher, L.H. (2010). Enterobacteriaceae act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. *Cell Host Microbe*, 8(3), 292-300. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.08.004>.
- [249]. Thakur, A., Dhammi, P., Saini, H.S., Kaur, S. (2015). Pathogenicity of bacteria isolated from gut of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) and fitness costs of insect associated with consumption of bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology*, 127, 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.02.007>.
- [250]. Ryu, J.H., Kim, S.H., Lee, H.Y., Bai, J.Y., Nam, Y.D., Bae, J.W., Lee, D.G., Shin, S.C., Ha, E.M., Lee, W.J. (2008). Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science*, 319(5864), 777-782. <https://doi.org/10.1126/science.1149357>.
- [251]. Vacheron, J., Pechy-Tarr, M., Brochet, S., Heiman, C.M., Stojiljkovic, M., Maurhofer, M., Keel, C. (2019). T6SS contributes to gut microbiome invasion and killing of an herbivorous pest insect by plant-beneficial *Pseudomonas protegens*. *The ISME J*, 13(5), 1318-1329. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0353-8>.
- [252]. Manjula, T.R., Kannan, G.S., Sivasubramanian, P. (2018). Field Efficacy of *Pseudomonas fluorescens* against the Cotton Aphid, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) in Bt and Non Bt Cotton. *Int J Curr Microbiol App Sci Special*, 1(6), 11-24.
- [253]. Hashimoto, Y. (2002). Study of the bacteria pathogenic for aphids: isolation of bacteria and identification of insecticidal compound. *Hokkaido Prefect Agric Exp Stn*. Hokkaido, Japan.
- [254]. Chen, W.J., Hsieh, F.C., Hsu, F.C., Tasy, Y.F., Liu, J.R., Shih, M.C. (2014). Characterization of an insecticidal toxin and pathogenicity of *Pseudomonas taiwanensis* against insects. *PLoS pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004288>.

- [255]. Bhattacharya, D., Nagpure, A., Gupta, R.K. (2007). Bacterial chitinases: Properties and potential. *Critical Rev Biotechnol*, 27(1), 21-28. <https://doi.org/10.1080/07388550601168223>.
- [256]. Suganthi, M., Senthilkumar, P., Arvinth, S, Chandrashekara, K.N. (2017). Chitinase from *Pseudomonas fluorescens* and its insecticidal activity against *Helopeltis theivora*. *J Gen Appl Microbiol*, 63(4), 222-227. <https://doi.org/10.2323/jgam.2016.11.001>.
- [257]. Chen, L., Jiang, H., Cheng, Q., Chen, J., Wu, G., Kumar, A., Sun, M., Liu, Z. (2015). Enhanced nematocidal potential of the chitinase pachi from *Pseudomonas aeruginosa* in association with Cry21Aa. *Sci Rep*, 5(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/srep14395>.
- [258]. Loper, J.E., Henkels, M.D., Rangel, L.I., Olcott, M.H., Walker, F.L., Bond, K.L., Kidarsa, T.A., Hesse, C.N., Sneh, B., Stockwell, V.O., Taylor, B.J. (2016). Rhizoxin analogs, orfamide A and chitinase production contribute to the toxicity of *Pseudomonas protegens* strain Pf-5 to *Drosophila melanogaster*. *Environ Microbiol*, 18(10), 3509-3521. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13369>.
- [259]. Rao, R., Fiandra, L., Giordana, B., De-Eguileor, M., Congiu, T., Burlini, N., Arciello, S., Corrado, G., Pennacchio, F. (2004). AcMNPV ChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of *Bombyx mori* larvae. *Insect Biochem Mol Biol*, 34(11), 1205-1213. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.08.002>
- [260]. Péchy-Tarr, M., Borel, N., Kupferschmied, P., Turner, V., Binggeli, O., Radovanovic, D., Maurhofer, M., Keel, C. (2013). Control and host-dependent activation of insect toxin expression in a root associated biocontrol pseudomonad. *Environ Microbiol*, 15(3), 736-750. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12050>.
- [261]. Péchy-Tarr, M., Bruck, D.J., Maurhofer, M., Fischer, E., Vogne, C., Henkels, M.D., Donahue, M.K., Grunder, J., Loper, J.E., Christoph, K. (2008). Molecular analysis of a novel gene cluster encoding an insect toxin in plant-associated strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Environ Microbiol*, 10(9), 2368-2386. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01662.x>.
- [262]. Castagnola, A., Stock, SP. (2014). Common virulence factors and tissue targets of entomopathogenic bacterial for biological control of Lepidopteran pests. *Insects*, 5(1), 139-166. <https://doi.org/10.3390/insects5010139>.
- [263]. Sevim, A., Eryuzlu, E., Demirbağ, Z., Demir, İ. (2012). A Novel cry2Ab gene from the indigenous isolate *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*. *J Microbiol Biotechnol*, 22(1), 137-144. <https://doi.org/10.4014/jmb.1108.08061>
- [264]. Al-Momani, F and Obeidat, M. (2013). Ecology, toxicity, and hydrolytic activities of *Bacillus thuringiensis* in forests. *Turk. J. Agric For*, 37(1), 76-82. <https://doi.org/10.3906/tar-1104-33>.
- [265]. Schnepf, E., Crickmore, N.V., VanRie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Dean, D. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 775-806. <https://doi.org/10.1128/mmbr.62.3.775-806.1998>.
- [266]. Ahmed, S.I. and Leather, S.R. (1994). Suitability and potential of entomopathogenic Microorganisms for forest pest management – some points for consideration. *Intern J Pest Management*, 40(4), 287-292. <https://doi.org/10.1080/09670879409371901>.

- [267]. Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., Fujiwara, T. (2007). Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. Nov *Int J Syst Evol. Microbiol*, 57(5), 1117-1125. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63867-0>.
- [268]. Jackson, T.A., Klein, M.G. (2006). Scarabs as pests: a continuing problem. *The Coleopterists Bulletin*, 60(5), 102-119. [https://doi.org/10.1649/0010-065X\(2006\)60\[102:SAPACP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1649/0010-065X(2006)60[102:SAPACP]2.0.CO;2).
- [269]. Alamuratov, R., Abdimurot, U., Pulatov, ZA. (2023). Evaluation of efficacy of *Bacillus thuringiensis* strains against plum aphid-*Hyalopterus pruni* (Geoffr) (Hemiptera: aphididae) in laboratory and field conditions. *Science and innovation International scientific journal*, 2(6), 155-160. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8092393>.
- [270]. Yamagiwa, M., Ogawa, R., Yasuda, K., Natsuyama, H., Sen, K., Sakai, H. (2002). Active form of dipteran-specific insecticidal protein Cry 11A produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66(3), 516-522. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.516>.
- [271]. Oulebsir-Mohandkaci, H, Benzina, F, Khemili-Talbi, S, Mohammedi, A, Halouane, F, Hadjouti R. (2022). Phylogeny and Molecular Study of Some Entomopathogenic Rhizobacteria Isolated from Two Regions in Algeria. *Current Research in Bioinformatics*, 8, 55-61. <https://doi.org/10.3844/ajbsp.2019.55.61>
- [272]. Krych, K.V., Johnson, J.L., Yousten, A.A. (1980). Deoxyribonucleic acid homologies among strains of *Bacillus sphaericus*. *Int J Syst Bacteriol*, 30(2), 476-484. <https://doi.org/10.1099/00207713-30-2-476>.
- [273]. Priest, F.G., Goodfellow, M., Todd, C. (1988). A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J Gen Microbiol*, 134(7), 1847-1882. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-7-1847>.
- [274]. Bambang, F.S., Bagyo, Y., Tri, A., Suharjono. (2015). Isolation of *Bacillus sphaericus* from Lombok Island, Indonesia, and Their Toxicity against *Anopheles aconitus*. *International Journal of Microbiology*, 854709, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2015/854709>
- [275]. Loulou, A., Mastore, M., Caramella, S., Bhat, A.H., Brivio, M.F., Machado, R.A.R., Kallel, S. (2023). Entomopathogenic potential of bacteria associated with soil-borne nematodes and insect immune responses to their infection. *PLoS ONE*, 18(1), 1-19. <https://doi.org/10.1371/journal>.
- [276]. Smith, B.R and Unckless, R.L. (2018). Draft genome sequence of *Lysinibacillus fusiformis* strain Juneja, a laboratory-derived pathogen of *Drosophila melanogaster*. *Genome Announc*, 6(5).
- [277]. Usta, M. (2021). Isolation and determination of bacterial microbiota of *Varroa destructor* and isolation of *Lysinibacillus* sp. from it. *Egypt J Biol Pest Control*, (31), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00482-7>.
- [278]. Jurat-Fuentes, J.L., Jackson, T.A. (2012). Bacterial Entomopathogens. *Insect Pathology*, 8, 265-349. DOI:10.1016/B978-0-12-384984-7.00008-7.

- [279]. Pigott, C.R and Ellar, D.J. (2007). Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71(2), 255-281. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00034-06>.
- [280]. Edreva, A. (2005). Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *Gen Appl Plant Physiol*, 31(1-2), 105-124.
- [281]. Toprak, U., Erlandson, M., Hegedus, D. (2010). Peritrophic matrix proteins. *Trends Entomol*, 6, 23-51.
- [282]. Charles, J.F., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C. (2000). Mode of action of *Bacillus sphaericus* on mosquito larvae: Incidence on resistance. In: *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application*, vol 3. London, UK pp 237-252.
- [283]. Charles, J.F and Nielsen-Leroux, C. (1996). Les bactéries entomopathogènes : Mode d'action sur les larves de moustiques et phénomènes de résistance. Article *In Annales de l'Institut Pasteur/Actualités*. 7(4), 233-245
- [284]. Gry, J., Coquard, J., Coquard, G. (1966). Appréciation en laboratoire de l'activité des insecticides à l'égard du criquet migrateur. *L'agronomie tropicale*, 21(6-7), 837-855. <https://agritrop.cirad.fr/435201/>.
- [285]. Bird, L.J., Akhurst, R.J. (2007). Variation in susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia to two *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(2), 84-94. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.08.005>.
- [286]. Limbu, J., Shrestha, B.K., Shakya, J., Khatri, S.B., Khanal, H. (2020). Isolation of *Bacillus thuri giensis* and its Insecticidal Effect against *Galleria mellonella*. *Himalayan Journal of Science and Technology*, 4, 96-102. <https://doi.org/10.3126/hijost.v4i0.33918>.
- [287]. Parajuli, P., Rana, N., Shrestha, S., Maharjan, J., Rana, P., Sijapati, J. (2015). Isolation and characterization of *Bacillus Thuringiensis* strains containing CryI genes from soil samples of Nepal. *Asian Jr of Microbiol Biotech Env Sc*, 17(3), 99-104.
- [288]. Mehtap, U. (2022). Local isolate of *Bacillus thuringiensis* (Berliner,1915) (Bacteria:Bacilaceae) from *Cydalima perspectalis* (Walker,1859) (Lepidoptera:Crambidae:Spilomelinae) includes cry1, cry3 and cry4 genes and their insecticidal activities. *Türk entomol derg*, 46(2), 227-237. <https://doi.org/10.16970/entoted.1017243>.
- [289]. Roberts, D. W. and Hajek, A. E. (1992). Entomopathogenic fungi as bioinsecticides, In Leatham, G. F. (ed.), *Frontiers in industrial mycology*. Chapman and Hall, New York. Pp,144 -159.
- [290]. Sivasankaran, P., Eswaramoorthy, S., David, H. (1998). Influence of temperature and relative humidity on the growth, sporulation and pathogenicity of *Beauveria bassiana*. *J. Biol. Control*, 12, 71-75.

Annexe

Annexe 01 : Analyse de la variance

Tableau I : ANOVA de l'effet des trois souches fongiques *in vitro* à différentes concentrations contre *H. pruni*

Source	DL	Som Car ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Temps	9	83553	9283,7	35,77	0,000
Isolat	2	277	138,7	0,53	0,587
Concentration	2	18571	9285,7	35,77	0,000
Erreur	256	66451	259,6		
Inadéquation de l'ajustement	76	23398	307,9	1,29	0,089
Erreur pure	180	43053	239,2		
Total	269	168853			

Tableau II : Résultats de l'ANOVA de la comparaison des moyennes de mortalité de *A.fabae* sous l'effet des trois souches fongiques *in vitro* à la concentration de 2.4×10^7 spores / ml

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Temps	2	82,1	41,03	0,15	0,864
Souche	2	4345,9	2172,95	7,82	0,003
Erreur	22	6112,3	277,83		
Inadéquation de l'ajustement	4	1026,8	256,70	0,91	0,480
Erreur pure	18	5085,5	282,53		
Total	26	10540,3			

Tableau III : ANOVA de l'effet de la souche A *in vivo* à différentes concentrations contre *A. fabae*.

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Temps	9	12564	1395,9	9,96	0,000
Concentration	2	11442	5720,9	40,81	0,000
Erreur	78	10935	140,2		
Inadéquation de l'ajustement	18	2502	139,0	0,99	0,484
Erreur pure	60	8432	140,5		
Total	89	34696			

Annexe 02 : Tableaux des équations de la droite de régression linéaire pour l'estimation des Concentrations Létales (CL), et les Temps Létaux (TL) des souches étudiées

- **Tableau IV :** Equations de la droite de régression linéaire pour l'estimation des Temps Létaux des trois souches fongiques contre *H.pruni in vitro*

Souche	Concentration	L'équation de la droite de régression	Coefficient de corrélation R ²
A	C1	$y = 1,3162x + 3,5046$	R ² = 0,5246
	C2	$y = 1,0955x + 3,6034$	R ² = 0,5784
	C3	$y = 1,7407x + 2,3042$	R ² = 0,7916
B	C1	$y = 2,0038x + 3,1056$	R ² = 0,7786
	C2	$y = 1,4552x + 3,3334$	R ² = 0,8567
	C3	$y = 1,7576x + 2,4751$	R ² = 0,5191
C	C1	$y = 3,1099x + 1,798$	R ² = 0,7305
	C2	$y = 3,4494x + 2,0483$	R ² = 0,912
	C3	$y = 1,9107x + 2,1326$	R ² = 0,5155

- **Tableau V :** Equations de la droite de régression linéaire pour l'estimation des Temps Létaux de la souche fongiques A contre *A.fabae in vivo*

Souche	Concentration	L'équation de la droite de régression	Coefficient de corrélation R ²
A	C1	$y = 2,0227x + 3,1982$	R ² = 0,926
	C2	$y = 1,5235x + 3,2516$	R ² = 0,8791
	C3	$y = 1,6151x + 2,3755$	R ² = 0,8457

- **Tableau VI :** Equations de la droite de régression linéaire pour l'estimation des Concentrations létales des trois souches fongiques contre *H.pruni in vitro*

Souche	L'équation de la droite de régression	Coefficient de corrélation R ²
A	$y = 0.54x + 1.6288$	R ² = 0.8388
B	$y = 1.1905x - 3.05$	R ² = 0.9123
C	$y = 0.62x + 1.1776$	R ² = 0.488

- **Tableau VII :** Equations de la droite de régression linéaire pour l'estimation des Concentrations létales de la souche fongiques A contre *A.fabae in vivo*

Souche	L'équation de la droite de régression	Coefficient de corrélation R ²
A	$y = 0,51x + 1,4463$	R ² = 0,9988

- **Tableau VIII :** Equations de la droite de régression linéaire pour l'estimation des Temps Létaux des souches bactériennes contre *H.pruni in vitro*

Souche	Concentration	L'équation de la droite de régression	Coefficient de corrélation R ²
B22	C1	$y = 3,2919x - 0,7311$	R ² = 0,8991
	C2	$y = 2,4229x + 0,5379$	R ² = 0,9977
	C3	$y = 5,4529x - 4,7413$	R ² = 0,912
	C4	$y = 5,3555x - 4,0352$	R ² = 0,7486
B23	C1	$y = 3,9612x - 1,6464$	R ² = 0,9837
	C2	$y = 4,0921x - 1,7074$	R ² = 0,9708
	C3	$y = 2,6189x + 0,5471$	R ² = 1
	C4	$y = 6,56x - 5,2633$	R ² = 0,9885
P2	C1	$y = 4,9058x - 3,5125$	R ² = 0,9998
	C2	$y = 4,3231x - 2,1989$	R ² = 0,9401
	C3	$y = 3,5809x - 0,8208$	R ² = 0,8267
	C4	$y = 3,5415x - 0,4129$	R ² = 0,9444
	C1	$y = 8,2245x - 8,3142$	R ² = 0,9889

P4	C2	$y = 4,4255x - 2,3765$	$R^2 = 0,9919$
	C3	$y = 8,9444x - 8,979$	$R^2 = 0,8981$
	C4	$y = 4,2943x - 2,2383$	$R^2 = 0,8632$
Bt	C1	$y = 4,2943x - 2,2383$	$R^2 = 0,8632$
	C2	$y = 1,028x + 2,8409$	$R^2 = 0,5019$
	C3	$y = 0,7272x + 3,2065$	$R^2 = 0,671$
	C4	$y = 1,2534x + 2,1153$	$R^2 = 0,9604$
Pf	C1	$y = 2,3346x + 0,6824$	$R^2 = 0,9439$
	C2	$y = 3,3755x - 0,9113$	$R^2 = 0,9356$
	C3	$y = 6,2519x - 5,999$	$R^2 = 0,9955$
	C4	$y = 4,0171x - 2,2646$	$R^2 = 0,9595$

- **Tableau IX :** Equations de la droite de régression linéaire pour l'estimation des Temps Létaux des souches bactériennes contre *A.fabae in vitro*

Souche	Concentration	L'équation de la droite de régression	Coefficient de corrélation R ²
B22	C1	$y = 2,0815x + 1,1099$	$R^2 = 0,9013$
	C2	$y = 3,2919x - 0,7311$	$R^2 = 0,8991$
	C3	$y = 3,5865x - 1,0266$	$R^2 = 0,6344$
	C4	$y = 5,3358x - 4,6962$	$R^2 = 1$
B23	C1	$y = 1,869x + 0,591$	$R^2 = 0,9301$
	C2	$y = 6,0156x - 5,7789$	$R^2 = 0,9414$
	C3	$y = 1,5727x + 1,6594$	$R^2 = 0,9361$
	C4	$y = 5,5447x - 5,0915$	$R^2 = 0,9609$
B24	C1	$y = 3,445x - 1,2483$	$R^2 = 0,9982$
	C2	$y = 2,1083x + 1,9594$	$R^2 = 0,9425$
	C3	$y = 1,8346x + 1,6574$	$R^2 = 0,9745$
	C4	$y = 2,3146x + 0,3884$	$R^2 = 0,9295$
P4	C1	$y = 2,7863x + 0,4397$	$R^2 = 0,4969$
	C2	$y = 4,6698x - 3,6896$	$R^2 = 0,9669$
	C3	$y = 3,1692x - 1,5603$	$R^2 = 0,8251$
	C4	$y = 5,4882x - 4,8391$	$R^2 = 0,9858$
Bt	C1	$y = 7,3199x - 7,3602$	$R^2 = 0,9221$
	C2	$y = 4,2613x - 2,8877$	$R^2 = 0,9896$
	C3	$y = 2,0868x + 0,7812$	$R^2 = 1$
	C4	$y = 2,116x + 0,3936$	$R^2 = 0,9524$
Pf	C1	$y = 2,2213x + 0,8845$	$R^2 = 0,9293$
	C2	$y = 3,3755x - 0,9113$	$R^2 = 0,9356$
	C3	$y = 6,2519x - 5,999$	$R^2 = 0,9955$
	C4	$y = 4,0171x - 2,2646$	$R^2 = 0,9595$

- **Tableau X :** Equations de la droite de régression linéaire pour l'estimation des Concentrations létales des souches bactériennes contre *H.pruni in vitro*

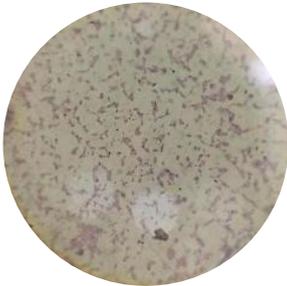
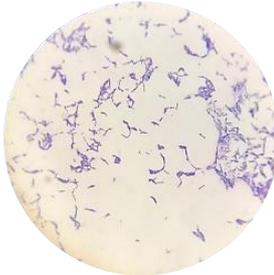
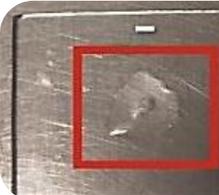
Souche	L'équation de la droite de régression	Coefficient de corrélation R ²
B22	$y = -0,322x + 7,743$	$R^2 = 0,5132$
B23	$y = -0,259x + 7,596$	$R^2 = 0,3274$
P2	$y = -0,155x + 6,755$	$R^2 = 0,9589$
P4	$y = 0,181x + 5,356$	$R^2 = 0,0394$
Bt	$y = 0,676x + 0,731$	$R^2 = 0,8022$
Pf	$y = -0,109x + 6,016$	$R^2 = 0,3497$

- **Tableau XI** : Equations de la droite de régression linéaire pour l'estimation des Concentrations létales des souches bactériennes contre *A.fabae in vitro*

Souche	L'équation de la droite de régression	Coefficient de corrélation R ²
B22	$y = -0,083x + 6,012$	R ² = 0,056
B23	$y = -0,335x + 7,06$	R ² = 0,322
B24	$y = 0,266x + 3,431$	R ² = 0,3501
P4	$y = 0,339x + 2,829$	R ² = 0,2679
<i>Bt</i>	$y = 0,656x + 0,896$	R ² = 0,7966
<i>Pf</i>	$y = -0,095x + 5,91$	R ² = 0,3422

Annexe 03 : Tableau des résultats d'indentification bactériens

Tableau XII : Résultats des tests d'orientation des isolats bactériens étudiés.

Test	Résultats	
Coloration de Gram		
	Gram - : couleur rose	Gram + : couleur violet
Test de catalase		
	Catalase - : Aucune bulle gazeuse n'apparait	Catalase + : apparition de bulles (dégagement gazeux de dioxygène)
Test de l'oxydase		
	Oxydase - (absence de coloration)	Oxydase + (couleur violacée indiquant la fixation d'oxygène)
Aspect sur milieu		<ol style="list-style-type: none"> 1. Culot jaune (glucose +) 2. Pente jaune (saccharose+/lactose +) 3. Noircissement le culot indique la production de H₂S + 4. découlement de la gélose (Gaz +)
Citrate de Simone		Citrate + : (changement de couleur du vert au bleu indique l'utilisation du citrate comme seule source de carbone par la bactérie)

Mannitol-Mobilité



Mannitol+ : virage au jaune (fermentation du mannitol)

Mannitol - : pas de fermentation

Mobilité + : diffusion des bacilles à partir de la ligne de piquer centrale en créant un trouble du milieu.

Mobilité - : bacilles immobiles se cultivant uniquement au niveau de la strie d'ensemencement

RESEARCH

Open Access



New insights on entomopathogenic bacteria isolated from soil of citrus crops to combat the polyphagous aphid pest *Hyalopterus pruni* (Geoffroy 1762) (Hemiptera, Aphididae)

Mohamed Hafsa^{1*} and Leila Allal Benfekih¹

Abstract

Background The employment of entomopathogenic microorganisms is a promising approach for ensuring optimal phytosanitary protection in the framework of biological management of insect crop pests. Among these microbes, entomopathogenic soil-borne bacteria are preferred over pesticides because they help successfully in the natural regulation of arthropod populations, as soil has a favorable ecology for the availability and richness of many beneficial bacterial species. In this study, it was focused on the isolation, identification and characterization of entomopathogenic bacteria isolated from cultivated citrus soils and on the evaluation of their insecticidal potential in the laboratory against the mealy plum aphid, *Hyalopterus pruni* (Geoffroy 1762) (Hemiptera: Aphididae), a polyphagous and major pest attacking and virus-transmitting of several *Prunus* crops.

Results Isolation results gave 11 bacterial isolates, which were more than 50% effective in selection tests on *H. pruni* aphids at 1×10^8 CFU/ml. A total of seven isolates generated significant insecticidal potential at different concentrations, and their molecular identification based on 16S rRNA genome sequencing yielded the following results: *Lysinibacillus fusiformis* (B4), *Bacillus thuringiensis* (B13), *B. thuringiensis* (B22), *B. thuringiensis* (B23), *B. thuringiensis* (B24), *Pseudomonas* sp. (P2) and *Enterococcus gallinarum* (P4). The most pathogenic potential of these strains was for *E. gallinarum* (P4), which induced 100% *H. pruni* mortality after 72 h of treatment at the concentration ($C_3 = 1 \times 10^6$ CFU/ml), followed by *B. thuringiensis* (B23), (B22), (B4), (P2), (B13) and (B24) isolates, which caused 96, 91, 85, 83, 65 and 50% mortality rates, respectively, at the lowest concentration ($C_4 = 1 \times 10^5$ CFU/ml). The LC_{50} and LT_{50} values were calculated for the entomopathogenic isolates of (P2), (P4), (B23) and (B24). A lowest LC_{50} value was 1.08×10^2 CFU/ml for (P4) *E. gallinarum* after 72 h of treatment, whereas (P2) *Pseudomonas* sp. presented the shortest LT_{50} of 33.6 h at concentration ($C_4 = 1 \times 10^5$ CFU/ml).

Conclusions The present study's outcomes have confirmed the existence, abundance, and variety of entomopathogenic bacteria at the soil level in citrus groves. Interestingly, these bacteria could be useful for aphids' population control on a wide scale through the utilization of their toxins and enzymes, even against insect pests of a broad order.

Keywords Biological control, Entomopathogenic bacteria, Soil, Insect pests, *Hyalopterus pruni*

*Correspondence:

Mohamed Hafsa
hafsamohamed560@gmail.com

¹ Laboratory for Research on Medicinal and Aromatic Plants, Faculty of Nature Sciences and Life, Saad Dahlab University, Blida 1, Road of Soumâa, 09000 Blida, Algeria

Background

Insect pests are part of bio-aggressors that pose a significant risk to agricultural output, impacting the production level, quality, and aesthetic value of the crop. Aphids belong to the "sap-sucking" pests which about



© The Author(s) 2024. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

100 species are considered severe agricultural and horticultural insect pests, directly responsible for destroying many economically significant crop plants. Population growth rate, considering the aphids' age-specific development, survival, and fecundity, accurately characterizes this pests' impact (Blackman and Eastop 2000). Aphids can cause not only direct damage by sucking sap, but also indirect damage as vectors for various viral diseases. *Prunus* crops, such as peaches, are considered to be the best-known cultures in terms of their economic impact and production (Rousselin et al. 2017) worldwide. The mealy plum aphid *Hyalopterus pruni* (Geoffroy 1762) (Hemiptera: Aphididae), is a major polyphagous pest to several crops, including the genus *Prunus* globally growing under temperate and Mediterranean climates and in Europe and North America (Rousselin et al. 2017). *H. pruni*, causes damage directly to *Prunus* trees by absorbing phloem sap, reducing fruit yield quality and causing chlorosis which consequently affects growth in the long term (Lozier et al. 2009). This aphid species is also the main vector for plum pox virus (PPV) transmission which is responsible for shark disease, causing major economic losses on *Prunus* genus trees (Hazir et al. 2021).

Chemical insecticides are still widely used in peach orchards to control the aphid population. Despite those chemical substances targeted effect, insect populations may swiftly acquire resistance, unfortunately making these insecticides useless and impeding long-term management (Paliwal et al. 2022). Furthermore, detrimental effects on human health due to the indiscriminate pesticide usage, inhalation poisoning, toxicity in the food chain, contamination of surface and groundwater, and other environmental issues pose a serious obstacle to the ability to safeguard the quantity and quality of numerous important crops.

Exploring soil-borne bacteria diversity remains an attractive alternative to develop biological control of insect pests using these natural microorganisms (Meddas et al. 2020). Indeed, the soil is a site of microbial competition because of its vast biological diversity, including rhizospheric bacteria that influence plant development and most importantly control insect pests in a variety of crops. Bacteria of the *Bacillus* and *Pseudomonas* genera are considered to be the most widely used rhizospheric bacteria for potential biological control since they are capable of efficiently combating a wide variety of commercially important insect pests (Oulebsir-Mohand kaci et al. 2015a, b).

Bacteria of the *Bacillus* genus such as *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) constitute approximately 95% of the global biopesticide economy, due to their extensive utilization as microbial control agents. The bacterium *B. thuringiensis* produces insecticidal proteins in the form of crystalline

inclusions during the sporulation phase, known as Cry or Cyt toxins, which have proved effective against important lepidopteran pests. Some *Bt* strains produce a binary toxin called Vip2Ae-Vip1Ae, in addition to new Cry proteins from the *Bt* strain H1.5 named Cry41Ab1 and Cry41Aa1, respectively (Palma et al. 2014). Likewise, *Pseudomonas* is recognized for its entomopathogenic activity against a variety of insect pests, such as aphids (Manjula et al. 2018). *P. fluorescens* can lessen the severity of numerous fungal illnesses and improve Plant Growth Promotion Rhizobacteria (PGPR) by the synthesis of several secondary metabolites, such as hydrogen cyanides, siderophores, and antibiotics (O'Sullivan and O'Gara 1992).

Sustainable methods that use beneficial microorganisms' natural insect diseases to reduce environmental harm, still become more meaningful to date. It has been determined that more than 100 bacterial species exhibiting entomopathogenic activity are exo- and endo-pathogens of arthropods. Aphid populations have been effectively controlled by entomopathogenic fungi, while bacterial control methods have achieved not much focus. This present investigation is based on the isolation and identification of rhizospheric bacteria from different soils cultivated on citrus, in order to investigate the insecticidal potential of effective isolates on the most damaging insect pest of *Prunus*, *Hyalopterus pruni*.

Methods

Soil sampling

Sampling techniques consisted of collecting sufficient soil volumes from four randomly selected locations in citrus groves. Soil samples were collected from the localities of Beni Mered, Mouzaïa, Oued El Alleug, Bougara, and Tabainat surrounding citrus area in the province of Blida (Central Mitidja plain, Algeria). Soils specimens were gathered from a depth of 10 to 15 cm near the root system, to isolate bacteria of the *Pseudomonas* genus (Bikram et al. 2018), and from a distance of 5 to 10 cm in the soil's uppermost stratum, in order to separate *Bacillus* strains (Mihir et al. 2017). Every soil sample collected was placed in hermetically sealed sterile plastic bags, until usage in the laboratory.

Bacteria isolation

Soil samples were dried separately, sieved, and finely ground. After that, 10 g of soil was suspended in 90 ml of sterile physiological water and then homogenized with a magnetic stirrer for 30 min. Successive dilutions were then prepared to obtain the final dilution of 10^{-5} from a 10^{-1} one. The dilutions used to isolate *Bacillus* bacteria were heated at 80 °C for 10 min to eradicate non-spore-forming bacteria, each prepared dilution was applied in

0.1 ml nutrient agar (NA). *Pseudomonas*, was incubated in a King B medium, which allows the production of fluorescein (Oulebsir-Mohand kaci et al. 2015a, b). Incubation was carried out at 30 °C for 24 h for *Bacillus* and at 28 ± 2 °C for 24 to 72 h in the case of *Pseudomonas*.

Identification of bacterial isolates

Morphological and biochemical characterization

The identification and taxonomic characterizations of isolated bacteria were based on several morphological characteristics corresponding mainly to the type of bacterial colony (size, shape, color, margin, opacity, and pigmentation), the shape of the bacterial cells, Gram staining and their mobility. Afterward, according to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology using morphological, physiological, and biochemical methods (Buchanan and Gibbons 1974), the colonies that seem to meet the criteria of the desired genera (*Bacillus* and *Pseudomonas*) were successively transplanted in adequate medium to obtain a pure culture.

Molecular identification

Molecular identification focused on the sequencing of 16S rRNA genes for the performing strains being most efficient against the mealy plum aphid *H. pruni* at different selected concentrations. Bacterial genomic DNA was extracted using the GF-1 Nucleic Acid Extraction Kit (Vivantis Technologies Sdn Bhd, Selangor DE, Malaysia). Isolated DNA was kept at 4 °C until needed for PCR. The amplification of the bacterial genomic extract was achieved using the primer set for the 16S rRNA gene (27F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' and 1492R 5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3') (Edwards et al. 1989) using a thermocycler (iCycler Bio-Rad, USA). The runs were as follows: initial denaturation at 94 °C for 12 min, followed by other denaturation for 30 s at 94 °C, 30-s annealing at 55 °C, and 1 min 40 s for a primer extension at 72 °C. The amplification was repeated in 30 cycles, followed by a final extension at 72 °C (7 min).

PCR products were separated into a 1.5% agarose gel (Sigma-Aldrich, USA), and the gel was viewed under UV light after staining with Midori Green Advance (Nippon Genetics, Japan) and inspected using a UV trans-illuminator. PCR electrophoresis products were purified (Clean-Upkit, Vivantis) for sequencing onto a 3130 Genetic Analyzer Capillary Array for detection (Applied Bio systems) in the forward and reverse directions in separate reactions and duplicates. A BLAST analysis was conducted on the 16S rRNA sequence data by comparing similarity percentages using the NCBI GenBank database (NCBI GenBank; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul et al. 1990). A phylogenetic tree

was created using Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 11) (Tamura et al. 2021).

Pathogenicity bioassays on *H. pruni*

Insect collection

The mealy plum aphid, *H. pruni* was collected from a non-treated peach orchard located in the experimental station at Saad Dahlab University Blida-1 (USDB-1), at the end of April 2022.

Preparation of bacterial suspensions

The isolated and characterized bacteria strains were purified on nutrient agar plates to get pure colonies for each isolate. After 24 h of incubation at 30 °C, a few colonies were collected and inoculated into 5 ml of nutrient broth to prepare the bacterial suspensions. The tubes containing bacterial solutions were incubated at 30 °C with 200 rpm shaking for 48 h to allow sporulation and crystal formation (Karungu et al. 2018). A volume of 1 ml of this bacterial solution was then seeded in tubes containing 5 ml of sterile distilled water. Bacterial concentrations used for bioassays were established by adjusting the optical density of the bacteria dilution at 625 nm to 0.1 (about 1×10^8 CFU/ml) (Agbe et al. 2020).

Screening tests and bioassays

Adults *H. pruni* were firstly treated in a preliminary test in triplicate with a bacterial suspension concentration of 1×10^8 CFU/ml, for all bacterial isolates (twenty-nine) in order to determine the most efficient isolate on aphids. Fresh peach leaves not infested with aphids were sterilized for two minutes with 2° chlorine bleach, then rinsed three times with sterile distilled water, dried with sterile absorbent paper and soaked on both sides for 2 min in the previously prepared bacterial suspension. Pathogenicity tests are based on soaking leaves in bacterial solutions, the way aphids feed by using their perforating mouthparts to penetrate plant tissues and extract sap from the phloem, ensuring that bacterial cells pass directly into the intestine. A number of 15 aphid individuals were then placed on the soaked leaves and put into sterile Petri dishes with wet piece cotton with sterile distilled water to maintain leaf vitality. The bacterial suspension was replaced with sterile distilled water for negative controls.

In further bioassay, isolates (11 isolates) that expressed more than 50% aphids mortality in the preliminary screening test were used at four different concentrations (1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 and 1×10^5 CFU/ml). Treatments were performed with 15 aphid individuals per replicate and three replicates per concentration. Positive controls leaves were soaked in the same concentrations solutions of referenced strains *Bacillus* sp. HF911367 (*Bt*) and

Pseudomonas sp. HF911366 (*Pf*) provided by laboratory of Valorization and Conservation of Biological Resources (VALCORE), M'Hamed Bougara University – Boumerdes (Algeria) (Oulebsir-Mohandkaci et al. 2015a, b) and negative controls infested leaves, were treated with sterile distilled water.

Mortality rate

Mortality rate was recorded after 24, 48, and 72 h, for all replicates both in screening tests and bioassays at different concentrations, based on the ratio of the total dead aphids number over the total aphids' number used in treated and controls. The observed mortality was corrected using the ABBOT formula, (Abbott 1925): Percentage of corrected mortality $MC\% = 100 * (M1 - M2/100 - M1)$, where M1 was the percentage of mortality observed in controls and M2 was the percentage of mortality observed among treated.

Statistical analysis

To determine differences among treatment means, analysis of variance was performed using XLSTAT 2023V 1.6.1410 for Windows and The IBM SPSS Statistics 20 software. In the event of significant differences, Tukey's HSD test and Student's t test were used to separate the means of the different treatments. All parameters were analyzed at the 5% significance level. For controls *Bt* and *Pf* strains and bacteria isolates potentially efficient at different concentrations on *H. pruni* individuals, probit analysis was used to calculate median lethal concentrations and times ($LC_{50/90}$, $LT_{50/90}$) using Fisher and Yates method (1971) (Finney 1971).

Results

Morphological and biochemical characterizations

Isolation from the soil of citrus orchards in the Blida region resulted in a total of 90 isolates, including initially the two desired genera *Bacillus* and *Pseudomonas*. After 24 and 48 h of incubation for the respective isolates, some colonies were observed that developed on nutrient agar (NA) and King B. Colonies that probably belonged to the desired genus were selected. All isolates belonging to the *Bacillus* genus were large 2–4 mm colonies, cream-beige color, dry with irregular contour while being opaque (Fig. 1a). *Pseudomonas*, colonies were characterized by a regular contour, opaque, rather large, and round (Fig. 1b), with the typical production of fluorescent pigment.

Molecular identification

GenBank accession number of the 16S rRNA gene sequences for strains: B4, B13, B22, B23, B24, P2 and P4 is OR915493, OR915490, OR915491, OR915495, OR915489, OR915494 and OR915492, respectively. BLAST analysis of the five bacterial strains coded, B1, B2, B3, B4, and B5, indicated that they belong to the genus *Bacillus* (Bacillaceae family) with very similar sequence (100%) to *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* (Table 1) (Fig. 2). The other isolates showed a 100% similarity sequence with other bacteria species. Strain B23 showed 100% similarity in his sequence with *Bacillus proteolyticus*, B24 and B13 with *B. wiedmannii* and B22 with strain *B. anthracis*. However, only two type strains, *Lysinibacillus fusiformis* and *L. sphaericus*, were closely linked to strain B6, which showed substantial sequence identity (100%). In other cases, P2 has a total similarity (100%) with *Pseudomonas* sp, whereas

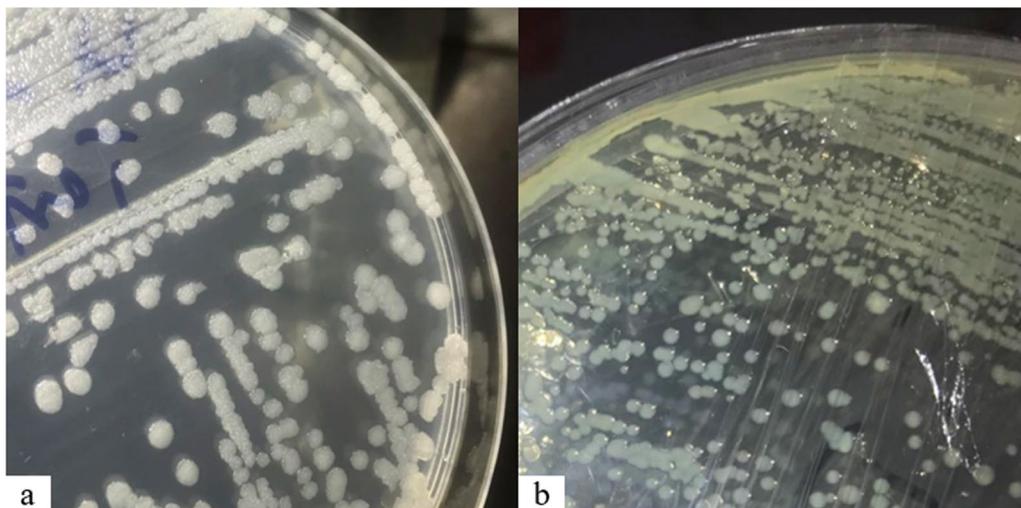


Fig. 1 Colony morphological of *Bacillus* in nutrient agar medium (a) and *Pseudomonas* in King B (b)

Table 1 Suggested identification of bacterial isolates, based on BLAST analysis of their 16S rRNA gene sequences

Isolate	GenBank identification suggestion	Similarity (%)	GenBank accession numbers
B23	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar tenebrionis strain NB176-1	100	CP114399.1
	<i>Bacillus cereus</i> strain LAM 30	100	EU019990.1
	<i>Bacillus proteolyticus</i> strain MRC_ZO3_41	100	OK605866.1
B24	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain HER1410	100	CP050183.1
	<i>Bacillus cereus</i> strain HZ-01	100	MT328556.1
	<i>Bacillus wiedmannii</i> G071	100	LC515603.1
B13	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain NBAIR_Bt104	100	OQ600809.1
	<i>Bacillus wiedmannii</i> strain SN2-2	100	MT071682.1
	<i>Bacillus cereus</i> strain ER5	100	MT124530.1
B22	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain FDAARGOS 791	100	CP054568.1
	<i>Bacillus anthracis</i> strain FDAARGOS 695	100	CP054816.1
	<i>Bacillus cereus</i> strain 65gite	100	MT378165.1
P4	<i>Enterococcus gallinarum</i> strain GI13	100	MT158590.1
	<i>Enterococcus</i> sp. CSQRZN3.4.9	100	LC484830.1
B4	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain Uyi_38	100	MT507231.1
	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain TB-22	100	KC540952.1
P2	<i>Pseudomonas</i> sp. strain BIS1097	100	MN810183.1
	<i>Pseudomonas</i> sp. strain P111-L04pd	100	MN043751.1

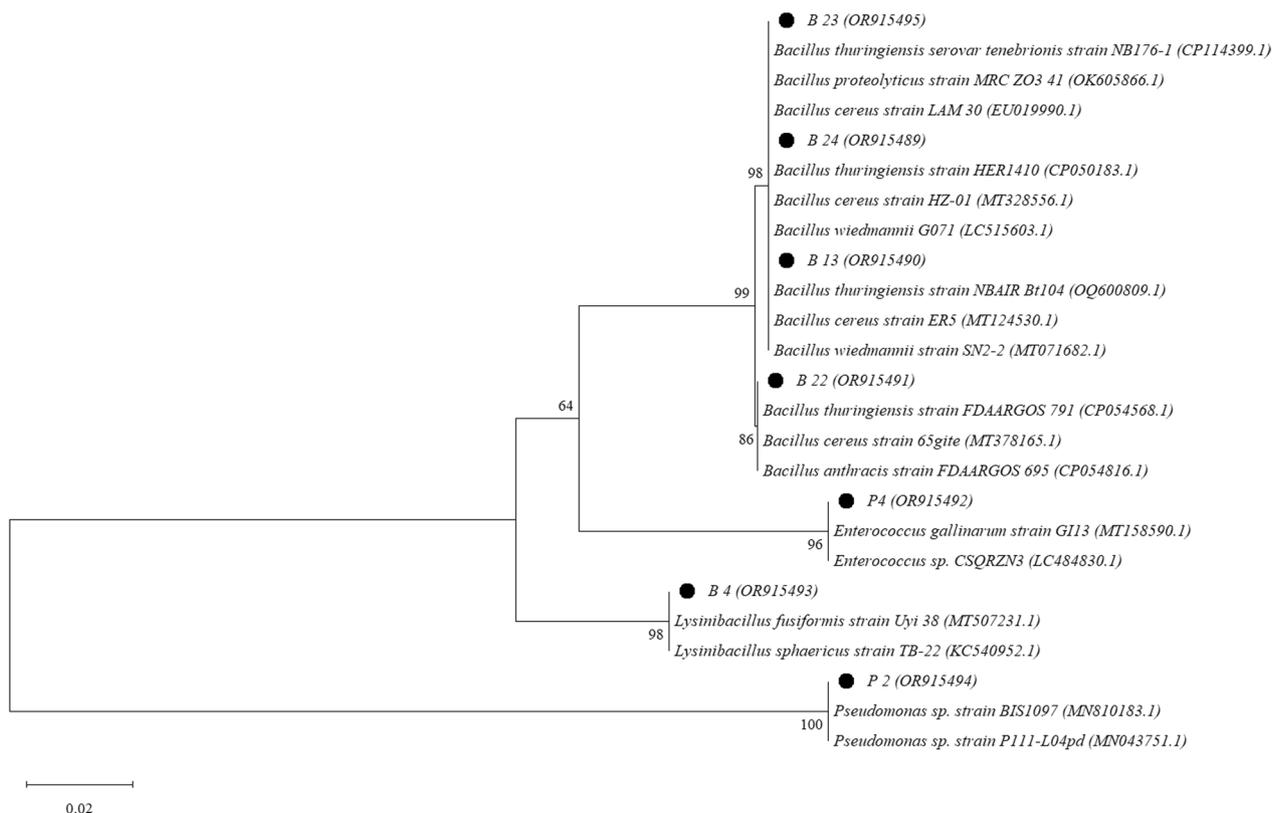


Fig. 2 Phylogenetic tree of selected isolates using neighbor-joining method based on 16S rRNA gene sequencing

P4 belongs to the *Enterococcus* genus, and presented a high sequence similarity (100%) with the strain *Enterococcus gallinarum* strain G113 (MT158590.1) and *Enterococcus* sp. (Table 1) (Fig. 2).

In conclusion, bacterial isolates were identified as follows: *B. thuringiensis* for B23, B24, B13 and B22 isolate, *Enterococcus gallinarum* (P4), *Lysinibacillus fusiformis* (B4) and *Pseudomonas* sp. (P2) (Table 2). The phylogenetic position of bacterial isolates (B23, B24, B13, B22, P4, B4, and P2) with closely related species based on 16S rRNA gene sequencing is shown in the

phylogenetic tree created using the neighbor-joining method (Fig. 2).

Screening tests

Corrected aphid mortality rates showed a highly significant difference at 72 h ($df=30$, $Fr=3.5$, $p<0.0001$) under the effect of the 1×10^8 CFU/ml concentration between *Bacillus* and *Pseudomonas* characterized isolates, including 5 *Pseudomonas* (P) and 22 *Bacillus* (B) isolates compared to controls *Bt* (*Bacillus* sp.) HF911367 and *Pf* (*Pseudomonas* sp.) HF911366 (Fig. 3).

Isolate P4 and *Bt* control strains produced very high mortality levels (95.83 and 93.81%, respectively) significantly different from those of strains B24, B17, B23, B14, P2, and B22 (24% of the total) which have generated fewer high effects on *H. pruni* mortality, ranging from 71.42 to 85.71%. The control *Pseudomonas* strain *Pf* and isolates B4, B13, B2, B15, P3, B16, P1, and B21 (31% of the total), have caused aphid mortalities ranging between 40 and 53%, whereas B18, B9, B20, B5, B19, B7, B8, B1, B3, B6, B12, and B11 strains (41.3% of the total) have induced much low mortality percentages varying from 12 to 34% (Fig. 3). Contrariwise, B10 isolate did not affect aphid mortality.

Table 2 Accession numbers of isolated bacteria in GenBank database

Isolates	Strains	Accession number
B4	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	OR915493
B13	<i>Bacillus thuringiensis</i>	OR915490
B22	<i>Bacillus thuringiensis</i>	OR915491
B23	<i>Bacillus thuringiensis</i>	OR915495
B24	<i>Bacillus thuringiensis</i>	OR915489
P2	<i>Pseudomonas</i> sp.	OR915494
P4	<i>Enterococcus gallinarum</i>	OR915492

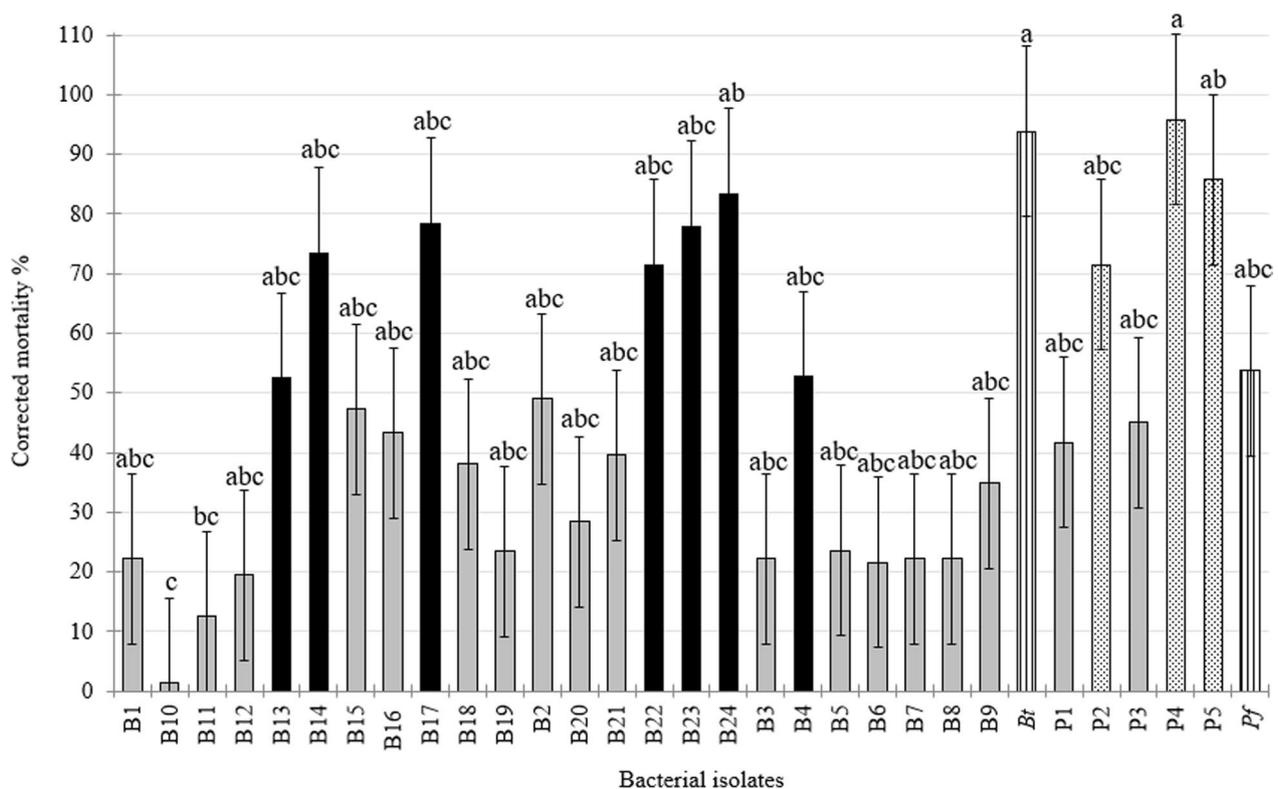


Fig. 3 Effect of all bacterial isolates against *Hyalopterus pruni*, 72 h after application at concentration 1×10^8 CFU/ml

**Evaluation of the selected isolates effect on *H. pruni*
Global effect with applied concentrations after 24, 48
and 72 h**

The estimated mean effect of the 4 applied concentrations between selected isolates ($n=10$ isolates) was significantly different ($df=22$, $Fr=3.886$, $P<0.0001$). Aphid *H. pruni* average mortality observed with all 10 selected isolates (B13, B14, B17, B22, B23, B24, control *Bt* and P2, P4, P5, control *Pf*) was less than 20% after 24 h of treatment with the fourth concentrations (C1 to C4). The four isolates (B22, B23, P2 and P4) demonstrated after 72 h greater than 50% mortality rate, but the three isolates (B23, P2 and P4) showed a mortality rate over 50% after 48 h (Fig. 4). At 72 h after treatment, isolate P4 showed the highest cumulative mortality rate (85.81%) on aphid *H. pruni*, compared to that of P2 and B23 isolates (76.98 to 79.15%), B22 isolate (71.94%) and to that of controls 61.62% (*Pf*) and 51.02% (*Bt*). Relatively even at 48 h, P4, P2, and B23 showed high mortality rates of 62.68, 64.15, and 60.20%, respectively, whereas *Bt* (22%) and *Pf* (32.39%) controls have induced much low mortality rates (Fig. 4). However, average *H. pruni* mortality rates were recorded 48.68% (B13), 48.21% (B24), 47.73% (B4), 39.45% (B14), 30.72% (P5), and 30.72% (B17) after 72 h and only counted between 15.84 and 25.60% for B13, B24, and B4, respectively, at 48 h.

Globally, increasing *H. pruni* aphid mortality percentages was time dependent ($df=2.000$, $Fr=189,669$,

$p<0.0001$). The best mortality rate (56.24%) was recorded after 72 h after treatment, followed by those recorded at 48 h (34.31%), then at 24 h after application of the treatments (9.62% only) (Table 3).

All the tested bacterial isolates concentrations (C1 to C4) have achieved a similar and low effect (6–14%) at 24 h, and a high mortality rate at the end of 72 h (Fig. 5).

Concentration C1 induced the highest mortality rate at 48 h (45.63%) and at 72 h (74.11%). Nevertheless, concentrations (C2, C3 and C4) had a convergent effect throughout the treatment period, with no significant difference between C2 (31.91%), C3 (28.92%) and C4 (30.77%) at 48 h, and also between C2 (48.05%), C3 (49.29%) and C3 (53.51%) after 72 h of treatment (Fig. 5). Tukey post hoc comparison showed a significant difference ($df=3$, $Fr=16.149$, $p<0.0001$) between the applied concentrations and within the time of treatment with the concentrations used ($df=6$, $Fr=2.529$, $p=0.021$).

Table 3 Average aphid mortality (%) under selected isolates effect after 24, 48, 72 h of treatment

Time after bacterial treatments (h)	Average aphid mortality rate
72	56.24a
48	34.31b
24	9.92c

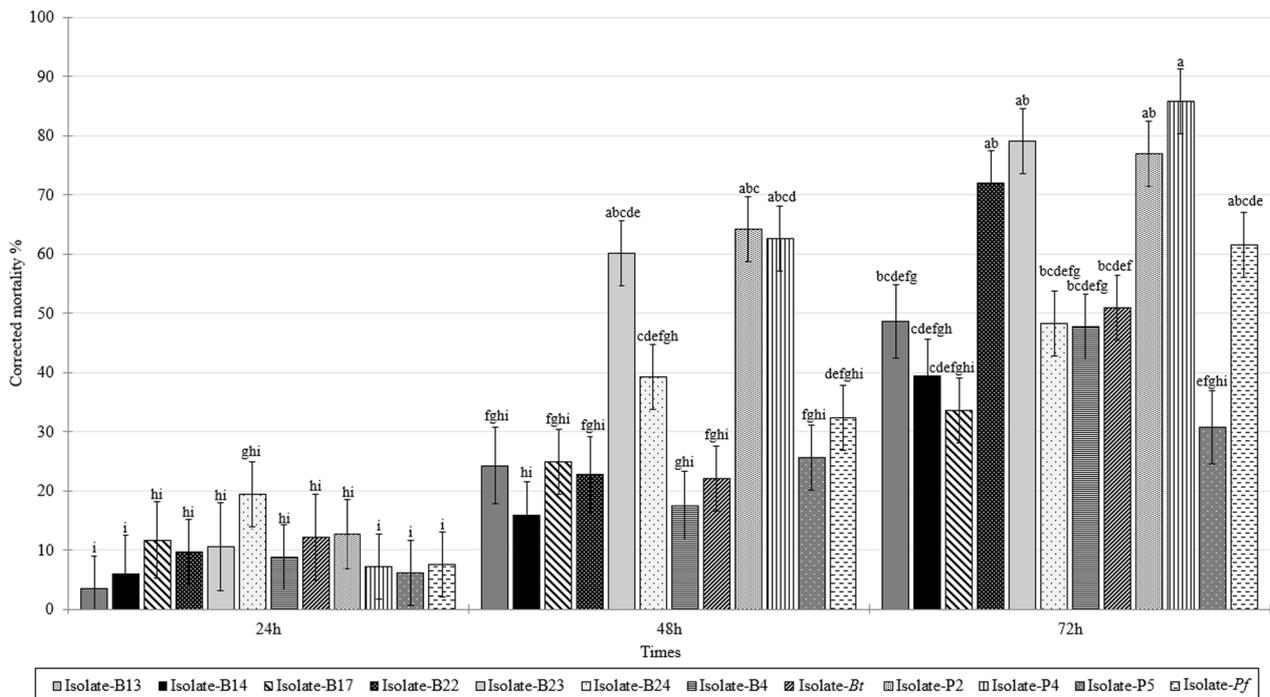


Fig. 4 Estimated means mortality of selected isolates 24, 48, 72 h after application at used concentrations

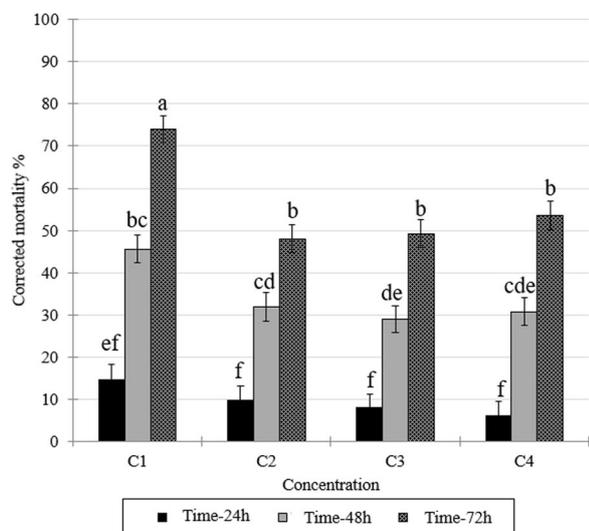


Fig. 5 Aphid *H. pruni* mortality after 24, 48 and 72 h with each concentration

Effect of the concentrations of selected isolates on *H. pruni* after 72 h of treatment

Accordingly, isolates P4, P5, B24, B17, B23, B14, P2, B22, B4, and B13 (Fig. 3), which have exhibited 50% of aphid mortality and more, were therefore tested at the concentrations (C1=1×10⁸ UFC/ml, C2=1×10⁷ UFC/ml, C3=1×10⁶ UFC/ml, C4=1×10⁵ UFC/ml), for a

duration time of 72 h. Evaluation of pathogenicity at these concentrations showed variable mortality rates on *H. pruni* (Fig. 6), (*df*=33, *Fr*=2,368, *p*=0.001). At the lowest concentration (C4), bacteria strains B23, B22, B4 and P2 induced high mortalities in *H. pruni* aphids 96, 91, 85 and 83%, respectively (Fig. 6). Moreover, these mortality rates were higher than those recorded in P4 (65.92%) and B13 (65.61%). With concentrations C2 and C3, P4 isolate caused as well very significant mortality of *H. pruni* aphids ranging from 80 to 100%, and even rather similar death rates (79 and 73%) with the isolate P2 were detected at these same concentrations. B23 and B22 also recorded high mortality rates at C3 and C2 but were less effective than those of P2 and P4, with rates of 74% (B22), 65% (B23), and 77.42% (B23) at C3, and 50.31% (B22) at C2, where B24 was 50% effective at this concentration. In contrast, isolate B4 recorded high mortality at the lowest concentration while showing low mortality at the other concentrations (C2 and C3). In comparison with the two referenced strains, *Bt* and *Pf*, the mortality rate decreased according to the concentrations prepared by *Bt*, where 45% (C2), 36% (C3), and 24% for the lowest concentration (C4) were recorded. In contrast, the *Pf* strain gave mortality rates of over 60% at treatments with low concentrations of C3 (73.61%) and C4 (61.80%), with a rate of 55.32% for C2. All isolates tested gave effective mortalities of between 51.37% and 95% at the highest concentration (C1) (Fig. 6).

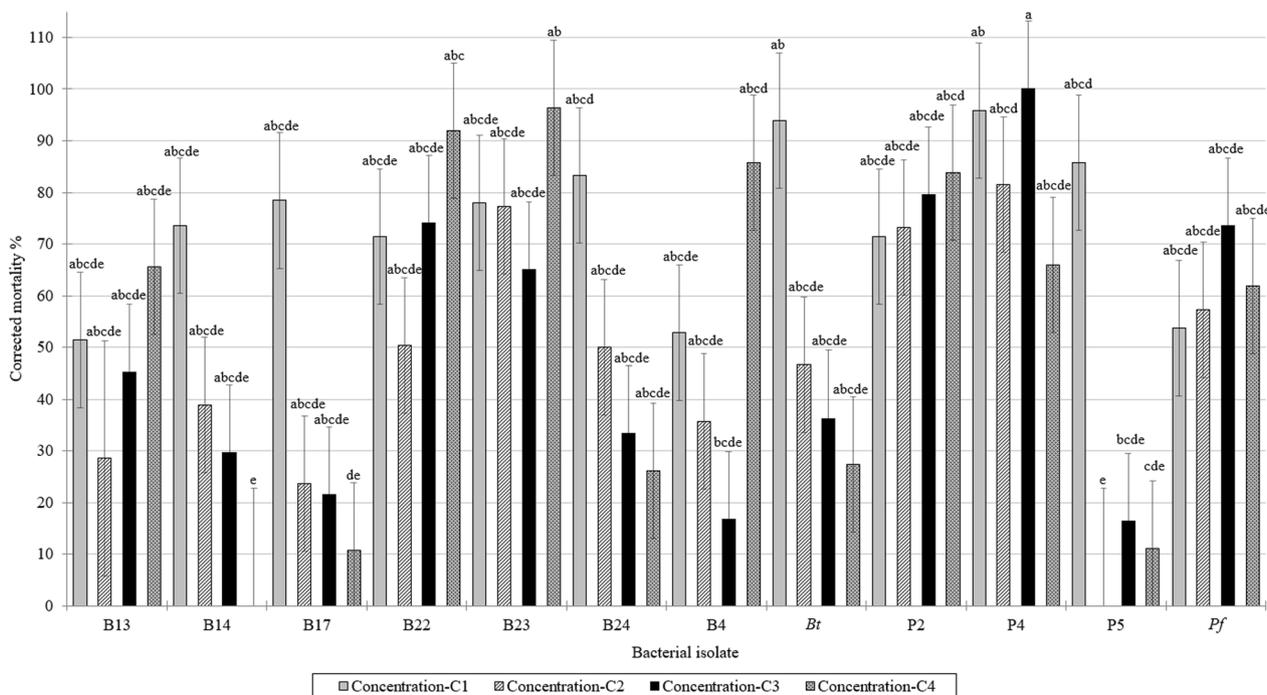


Fig. 6 Effect of selected isolate at different doses after 72h of application against *Hyalopterus pruni*

Determination of lethal concentration (LC₅₀, LC₉₀) values

LC₅₀ of isolate P4 (*Enterococcus galinarum*) was the lowest (1.08×10^2 CFU/ml) among all the other potentially most efficient isolates after 72 h of treatment and the positive controls *Bt* and *Pf* (Table 4). Notably, strain P2 showed the lowest LC₉₀ (1.16×10^3 CFU/ml) after 72 h of treatment (Table 4).

Determination of lethal time (LT₅₀, LT₉₀) values

The lowest LT₅₀ value (33.6 h) for P2 strain effect was recorded after treatment with concentration C4 (1×10^5 CFU/ml). In contrarily, P4 isolate exhibited the lowest LT₉₀ (50.4 h) after treatment with concentration C3 (1×10^6 CFU/ml) (Table 5).

Discussion

Obtained results have shown that B4, B22, B23, B24, B13, P2, and P4 isolates have generated high mortality rates against *H. pruni*. These isolates were identified as *Bacillus*, *Pseudomonas*, and *Enterococci* genera, using 16S rRNA gene sequence analysis. Bacillaceae and Pseudomonadaceae were already known to occur in soil (Oulebsir-Mohand kaci et al. 2015a, b). Enterococcaceae have also been isolated from soil (Falcone et al. 2017).

P4 strain (*Enterococcus galinarum*) was the most effective to kill *H. pruni* as the average recorded 85.5% of mortality which was obtained for the four tested concentrations, and still total aphids mortality (100%) has been

reached after 72 h with a concentration of 1×10^6 CFU / ml. Several studies have focused on isolating *Enterococci* species from various gut insects to using these bacteria for biological control, as they cause sepsis and rapid death when trans-locating toward the hemolymph, (Mason et al. 2011). According to the literature, *Enterococcus* genus has not been tested against aphids (Hemiptera) but in the present study, the species *E. gallinarum* isolated from soil and tested against *H. pruni* aphids, has proven an aphicidal effect.

Compared to *Pseudomonas*, the P2 strain (*Pseudomonas* sp.) also caused 83% mortality rate after 72 h of treatment with the lowest concentration (C4 = 1×10^5 CFU/ml). *P. fluorescens* strains have insecticidal activity against agricultural pests, including aphids (Kupferschmied et al. 2013). Our results corroborate those of Paliwal et al (2022), who successfully demonstrated that *P. fluorescens* presented 100% mortality after 72 h of treatment against the green peach aphid *Myzus persicae*, but at the concentration of 1×10^7 CFU/ml. Furthermore, Manjula et al (2018) confirmed *P. fluorescens* efficacy against the cotton aphid, *Aphis gossypii*, causing 65.3% reduction after 1% foliar application. On the other hand, Hashimoto et al. (2002) identified *P. fluorescens* and other bacteria as possible pathogens for aphid *Myzus persicae*.

In this study, the difference in aphid mortalities recorded with P2 isolate (*Pseudomonas* sp.) in comparison with those of the referenced strain *pf* (HF911366) may be explained by host insect specificity, given that the referenced strain was tested for its insecticidal effect on *L. migratoria* larvae and *G. mellonella* (Oulebsir-Mohand kaci et al. 2015a, b). Thus, Paliwal et al (2022) found different mortality rates having been caused by *P. fluorescens* (PfR37) on two different species of aphids (*Myzus persicae* and *Aphis fabae*).

B. thuringiensis strains B23 and B22 were responsible for the highest *H. pruni* aphids mortality at the lowest concentration (C4 = 1×10^5 CFU/ml), (96% and 92%, respectively). Our results match with those of

Table 4 Lethal concentration values (CFU/ml) for B22, B23, P2, P4 isolates compared to *Bt* (HF911367) *Pf* (HF911366)

Bacterial isolates	LC ₅₀	LC ₉₀
B22	3.30×10^8	3.50×10^4
B23	1.05×10^{10}	1.21×10^5
P2	2.10×10^{11}	1.16×10^3
P4	1.08×10^2	1.27×10^5
<i>Bt</i>	2.07×10^6	1.62×10^8
<i>Pf</i>	2.09×10^9	3.78×10^3

Table 5 Median lethal times values (hours) for B22, B23, P2, P4 isolates compared to *Bt* (HF911367) and *Pf* (HF911366)

Bacterial isolates	C1 (1×10^8 CFU/ml)		C2 (1×10^7 CFU/ml)		C3 (1×10^6 CFU/ml)		C4 (1×10^5 CFU/ml)	
	LT ₅₀	LT ₉₀	LT ₅₀	LT ₉₀	LT ₅₀	LT ₉₀	LT ₅₀	LT ₉₀
B22	55.2	134.4	69.6	235.2	60	105.6	48	84
B23	48	100.8	43.2	88.8	50.4	153.6	36	57.6
P2	55.2	98.4	45.6	91.2	43.2	96	33.6	76.8
P4	40.8	60	45.6	91.2	36	50.4	48	96
<i>Bt</i>	40.8	86.4	124.8	2215.2	292.8	16,845.6	199.2	2102.4
<i>Pf</i>	69.6	249.6	55.2	134.4	57.6	91.2	64.8	134.4

Alamuratov et al. (2023) who demonstrated that *Bt* has an entomopathogenic effect against *H. pruni* with a 69.5% mortality as the best efficiency obtained at concentration 2×10^8 CFU/ml after 72 h in laboratory conditions. The same authors observed similarly different mortality rates due to other *Bt* strains using the same concentration. These results are similar with our finding related to variable aphid's mortalities observed with *Bt* isolates B13 and B24 that generated low insecticidal potential compared to *Bt* strains (B23, B22). Previous works also found this difference in insecticidal potential of multiple soil-borne *B. thuringiensis* strains on lepidopteran and dipteran insects (Astuti et al. 2018) and on the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Porcar et al. 2009). This difference can be explained by the host specificity of many *B. thuringiensis* sub-species related to the variation of insecticidal activity of the endotoxins they produce (Yamagiwa et al. 2002).

P4 isolate (*Enterococcus gallinarum*) was found to be the most potent among the tested isolates. As the *Enterococcus*' genus is a component of insects' gut microbiota (Cox and Gilmore 2007) ingesting a small quantity of these bacteria may thus cause intestinal disturbances with commensal bacteria of the same genus, which explains why this low concentration could cause mortality in populations of *H. pruni* aphids.

In the present study, results highlighted that both strains P4 and P2 displayed the best insecticidal potential against *H. pruni* aphids. Paliwal et al (2022) mentioned that a low concentration (5.24×10^1 CFU/ml) for this same bacteria species was sufficient to cause 50% mortality of several aphid species after 72 h of treatment.

Compared to the other potentially effective strains (P2, P4), *Bt* strains B22 and B23 showed however high levels of LC and LT against *H. pruni* aphids. Alamuratov et al. (2023) have found a *Bt* concentration of 2×10^8 CFU/ml that induced mortality range varying between 63.5 and 35.2% after 72 h of treatment. So, according to our finding, selected *Bt* soil-borne strains do not have the best insecticidal effects after 72 h of treatment against *H. pruni* as *Pseudomonas* and *Enterococci* strains have. *Bt* strains used as controls showed lifted LC and LT. This could be due to variations in the insecticidal genes availability, the aphids species utilized, or the applied bioassay methodology and more precisely host specificity (Meddas et al. 2020).

Conclusion

The study involves isolating and characterizing bacteria from cultivated citrus soil, followed by an evaluation of their pathogenic potential against the mealy plum aphid, *Hyalopterus pruni*. The selected bacterial isolates showed high mortality in *H. pruni* populations after 72 h of treatment revealed the presence of three different

genera of entomopathogenic bacteria. This ensures that citrus soils contain a high diversity of entomopathogenic bacteria. Also, *Enterococcus gallinarum* species of *Enterococci* genus was available in cultivated soil ecology and generates the best mortality rate compared to other genera, highlighting the greatest importance of this genus in aphid control applications. Moreover, *Bacillus* and *Pseudomonas* genera had a pathogenic effect. The pathogenic effect of a new species, *Lysinibacillus fusiformis*, of the *Bacillus* genus, was already known for its insecticidal effect against another order of insects (Lepidoptera). Ultimately, this work will provide an opportunity to develop and study the active molecules and toxins of *B. thuringiensis* and *Pseudomonas* sp., which their entomopathogenic effects have already proved and to exploit the impact of the new species, *E. gallinarum* and *L. fusiformis*, as microbial bioinsecticides against aphids and various other insect pests.

Abbreviations

<	Less than
>	Greater than
±	Plus or minus
°	Degree
°C	Degree centigrade
16S rRNA	Small subunit ribosomal RNA molecules
ANOVA	Analysis of variance
BLAST	Basic local alignment search tool
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
C	Concentration
CFU	Colony-forming units
cm	Centimeter
<i>df</i>	Degree of freedom
DNA	Deoxyribonucleic acid
e.g.	Example
Etc	And the rest
FAO	Food and Agriculture Organization
h	Hours
<i>H. pruni</i>	<i>Hyalopterus pruni</i>
H ₂ S	Sulfure d'hydrogène
LC	Lethal concentrations
LSD	Least significant difference
LT	Lethal time
MEGA	Molecular evolutionary genetics analysis
ml	Milliliter
NA	Nutrient agar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
PCR	Polymerase chain reaction
<i>Pf</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
PGPR	Plant growth promotion <i>Rhizobacteria</i>
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Revolutions per minute
spp	Species
UV	Ultraviolet

Acknowledgements

Not applicable.

Author contributions

MH conducted the experiments and wrote the paper. The results were evaluated and processed by MH and LAB. The manuscript was reviewed and modified by LAB. For final submission, the work was read and approved by all authors.

Funding

Not applicable.

Availability of data and materials

The data generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author.

Declarations**Ethics approval and consent to participate**

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 22 April 2024 Accepted: 17 August 2024

Published online: 24 August 2024

References

- Abbot WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18:265–267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Agbe H, Sarkar DK, Chen XG (2020) Tunable superhydrophobic aluminum surfaces with anti-biofouling and antibacterial properties. *Coatings* 10(10):1–10. <https://doi.org/10.3390/coatings10100982>
- Alamuratov R, Abdimurot U, Pulatov ZA (2023) Evaluation of efficacy of *Bacillus thuringiensis* strains against plum aphid-*Hyalopterus pruni* (Geoffr) (Hemiptera: Aphididae) in laboratory and field conditions. *Sci Innov Int Sci J* 2(6):155–160. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8092393>
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3):403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Astuti DT, Pujastuti Y, Suparman SHK, Damiri N, Nugraha S, Sembiring ER, Mulawarman (2018) Exploration of *Bacillus thuringiensis* Berl. from soil and screening test its toxicity on insects of Lepidoptera order. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 102:1–7. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/102/1/012063>
- Bikream N, Shrestha J, Bhattarai S (2018) Identification of *Pseudomonas fluorescens* using different biochemical tests. *Int J Appl Biol* 2(2):27–32. <https://doi.org/10.20956/ijab.v2i2.5260>
- Blackman RL, Eastop VF (2000) Aphids on the world's crops: an identification and information guide, 2nd edn. Wiley, Chichester
- Buchanan RE, Gibbons NE (1974) *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th edn. Williams and Wilkins, Baltimore
- Cox CR, Gilmore MS (2007) Native microbial colonization of *Drosophila melanogaster* and its use as a model of *Enterococcus faecalis* pathogenesis. *Infect Immun* 75(4):1565–1576. <https://doi.org/10.1128/IAI.01496-06>
- Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Emde M, Böttger EC (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 17(19):7843–7853. <https://doi.org/10.1093/nar/17.19.7843>
- Falcone N, She Z, Chen C, Dong B, Yi D, Kraatz HB (2017) Demonstration of a tailorable and PCR-free detection of *Enterococcus* DNA isolated from soil samples. *Anal Methods* 9(10):1–7. <https://doi.org/10.1039/c6ay03309a>
- Finney DJ (1971) *Probit analysis*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge
- Hashimoto Y (2002) Study of the bacteria pathogenic for aphids: isolation of bacteria and identification of insecticidal compound. (Hokkaido Prefect Agric Exp Stn), Hokkaido, Japan
- Hazir A, Yurtmen M, Fidan H (2021) Potential aphid (Hemiptera: Aphididae) vectors of plum-pox virus (Virus: Potyviridae) and status of sharka disease in stone fruit orchards in the east Mediterranean Region of Turkey. *J Agric Sci* 7(4):484–492. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.722483>
- Karungu S, Huang D, Atoni E, Waruhui C, Agwanda B, Hu X, Yuan Z (2018) Isolation, identification and evaluation of mosquito entomopathogenic *Bacillus* species and related genera from randomly selected sites in Kenya. *Afr J Microbiol Res* 12(12):290–299. <https://doi.org/10.5897/AJMR2018.8824>
- Kupferschmid P, Maurhofer M, Keel C (2013) Promise for plant pest control: root-associated pseudomonads with insecticidal activities. *Front Plant Sci* 4(287):1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00287>
- Lozier JD, Roderick GK, Mills NJ (2009) Tracing the invasion history of mealy plum aphid, *Hyalopterus pruni* (Hemiptera: Aphididae), in North America: a population genetics approach. *Biol Invasions* 11(2):299–314. <https://doi.org/10.1007/s10530-008-9248-8>
- Manjula TR, Kannan GS, Sivasubramanian P (2018) Field efficacy of *Pseudomonas fluorescens* against the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) in Bt and Non Bt Cotton. *Int J Curr Microbiol App Sci Special* 1(6):11–24
- Mason KL, Stepien TA, Blum JE, Holt JF, Labbe NH, Rush JS, Raffa KF, Handelsmana J (2011) From commensal to pathogen: translocation of *Enterococcus faecalis* from the Midgut to the Hemocoel of *Manduca sexta*. *Mbio* 2(3):1–7. <https://doi.org/10.1128/mbio.00065-11>
- Meddas S, Oulebsir-Mohand Kaci H, Hadjouti R, Reghmit N, Houas Y, Amirat D, Nait-Bouda L, Doumandji-Mitiche B (2020) Caractérisation des *Bacillus* spp. Isolées du sol d'olivier et étude de leurs potentialités de biocontrôle contre la mouche de l'olive *Dacus oleae* (Gmel) au nord de l'Algérie. *Agrobiologia*. 10(1):1872–1882
- Mihir R, Shaswat S, Sumita A, Bidyut Kumar S (2017) Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains native to Assam soil of north east India. *3 Biotech*. 7:303. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0935-y>
- O'Sullivan DB, O'Gara F (1992) Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol Rev* 56(4):662–676. <https://doi.org/10.1128/mr.56.4.662-676.1992>
- Oulebsir-Mohand Kaci H, Doumandji-Mitiche B, Behidj N (2015a) Evaluation de la toxicité de *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus sphaericus* à l'égard du criquet migrateur *Locusta migratoria* (Linné, 1758). *Revue Nat Technol* 12(1):100–109
- Oulebsir-Mohand Kaci H, Khemili-Talbi S, Benzina F, Halouane F (2015b) Isolation and of entomopathogenic bacteria from algerian desert soil and their effects against the migratory locust, *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758) (Orthoptera: Acrididae). *Egypt J Biol Pest Control* 25(3):739–746
- Paliwal D, Hamilton AJ, Barrett GA, Alberti F, Van Emden H, Monteil CL, Mauchline TH, Nauen R, Wagstaff C, Bass C, Jackson RW (2022) Identification of novel aphid-killing bacteria to protect plants. *Microb Biotechnol* 15(4):1203–1220. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13902>
- Palma L, Munoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P (2014) Draft genome sequences of two *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a putative 41.9-kDa insecticidal toxin. *Toxins* 6(5):1490–1504. <https://doi.org/10.3390/toxins6051490>
- Porcar M, Grenier AM, Federici B, Rahbe Y (2009) Effects of *Bacillus thuringiensis* α -endotoxins on the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Appl Environ Microbiol* 75(14):4897–4900. <https://doi.org/10.1128/AEM.00686-09>
- Rousselin A, Bevacqua D, Sauge MH, Lescourret F, Mody K, Jordan MO (2017) Harnessing the aphid life cycle to reduce insecticide reliance in apple and peach orchards. A review. *Agron Sustain Dev* 37(38):1–13. <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0444-8>
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol Biol Evol* 38(7):3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Yamagiwa M, Ogawa R, Yasuda K, Natsuyama H, Sen K, Sakai H (2002) Active form of dipteran-specific insecticidal protein Cry 11A produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Biosci Biotechnol Biochem 66(3):516–522. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.516>

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.