

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA 1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DES BIOTECHNOLOGIES

ET AGROECOLOGIE



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master II

Spécialité : Biotechnologie microbienne

THEME :

Etude de l'Antagonisme Bactérien dans le Bio-contrôle
De Quelques Champignons Phytopathogènes

Réaliser par :

Zerrouki Wafia

Slamani Meroua

Membre du jury :

Mme BENOUSSAID.N

M.C.B

USDB1

Présidente

Mme TOUA.D

M.A.A

USDB1

Promotrice

Mme AMMAD.F

M.C.A

USDB1

Examinatrice

Année universitaire : 2021/2022

- Remerciement-

Au terme de ce mémoire, nous remercions en premier lieu Le bon Dieu le tout puissant de nous avoir illuminé et ouvert les portes du savoir et nous donné la volonté et le courage d'élaborer ce modeste travail. Nous voulons adresser tous nos remerciements aux personnes qui, d'une façon ou d'une autre, nous aidé durant la réalisation de notre mémoire.

Nous tenons à exprimer, en premier lieu, nos plus vifs remerciements au Pr. Benchabane qui a toujours été attentif et compréhensif. Nous tenons à vous remercier pour votre engagement et vos enseignements, ainsi que votre soutien tout au long de ces années de formation. Nous remercions également nos promotrice, Mme Toua.D d'avoir été si patiente avec nous et de nous soutenir lors de ce travail. Nous avons grandement appréciée votre soutien, votre aide et le temps que vous avez consacré.

Nous remercions très chaleureusement les membres de jury : MTM Ammad.F et Mm Benoussaid.N d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

Nous remercions grandement nos enseignants, qui ont enrichi nos connaissances et de nous avoir guidé durant toute ces années, en particulier, Pr. Krimi Z., Mme Toua D., Mme Ammad F. et bien sûr notre Professeur Benchabane M.et Mdm Benkortbey , nous voudrais que vous sachiez que vos étudiants garderont toute leur vie un très bon souvenir de ces années d'études.

Nous n'oublierons pas non plus tous mes collègues particulièrement mon binôme, ainsi que tous nos collègues de la promotion BTM.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à ceux et celles qui nous a supporté, encouragé ou contribué à la réalisation de ce travail.

- Dédicaces-

Et enfin, j'ai fini mon projet de fin d'études

Merci à Dieu d'abord, et merci à mes parents, et à toutes les personnes qui m'ont soutenu et y ont participé, même avec la petit chose.

Je dédie ce travail premièrement à ma mère qui veillait avec moi les nuits depuis mon plus jeune âge et me soutenait avec toutes ses forces, ma mère qui était mon refuge quand j'étais faible.

A mon père qui a toujours été mon soutien et ma force, mon père ma consolation et ma fierté, mon père qui s'est efforcé de réaliser mon rêve, me voici aujourd'hui.

A mon frère aîné, qui était comme mon deuxième père, Abd al-Raouf, mon frère Ishak et ma chère sœur, Douceur de la Maison, Malak.

Et je n'oublierai pas mon amie et mon binome Meroua, qui a enduré avec moi les épreuves de ce travail et partagé nos joies, nos tristesses et nos pleurs.

Et tous ceux qui ont participé à la réalisation de ce travail de près ou de loin, mes chères amies Maroua, Lina, Khawla, Chaima ,ma cousine Fethia et toute ma famille.

Et je souhaite que Dieu me protège tous mes êtres chers, et me le garde toujours près de moi

Merci à tous

Zerrouki wafia

- Dédicaces -

A MES CHERS PARENTS

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Que ce modeste travail soit le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitte jamais assez.

Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A mes chers et adorables Frères, que j'aime profondément. A toute ma grande famille et tous mes amis.

Slamani meroua

Résumé

Etude de l'Antagonisme Bactérien dans le Bio-contrôle De Quelques Champignons Phytopathogène :

La lutte biologique devient une alternative prometteuse pour réduire l'effet des produits chimique (pesticides, dont la pollution des sols) ce qui a causé des problèmes sérieux sur l'environnement et la santé du consommateur, dans cette optique notre travaille porte sur l'étude des potentialités antagoniste *in-vitro* et *in vivo* de quelques souches rhisosphérique contre des champignons phytopathogène affectant les cultures fourragères.

Dans notre travail nous avons fait une synthèse à partir des deux articles portant sur l'utilisation des rhizobactéries dans le biocontrôle des maladies affectant le **maïs** dans différentes régions dans le monde.

Dans le premier article, les souches bactériennes utilisées sont *Bacillus subtilus* contre les agents phytopathogène de genre *Fusarium* dans deux milieux PDA et TSA. Ces souches ont montré des taux d'inhibition allant de 11.66 % jusqu'au 58.33 %. En plus de test d'antagonisme *in vitro*, les auteurs de ce article en fait des autres expériences concernant l'étude de l'effet antagoniste sur le nombre et la germination des spores , l'étude des effets des composé volatiles sécréter par la bactérie antagoniste et aussi une étude concernant l'essai d'antagonisme *in vivo* et par résultat la souche qui a montré une grande efficacité contre l'inhibition de croissance mycélienne c'est la souche SR-146 par un taux de 58 % .

Dans le deuxième article, les rhizobactéries des genres *Bacillus* et *Pseudomonas* testées ont montré des niveaux différents d'inhibition de la croissance mycélienne *in vitro* de *Colletotrichum graminicola*. Rhizobactérie P23, du genre *Pseudomonas*, a provoqué une plus grande inhibition *in vitro* a un taux de 34,32 % contre *C.graminicola*, montrant un potentiel d'utilisation dans les futurs programmes de lutte biologique contre l'antracnose foliaire du Maïs.

Ces résultats indiquent que le biocontrôle rend la plante tolérante à la maladie en réduisant fortement l'évolution et en retardant l'apparition des symptômes, que l'inhibition totale du déclenchement de ces derniers.

Mots clés : Bactéries rhisosphériques Antagonisme, cultures fourragères, biocontrôle, Maïs, Champignons phytopathogènes, Mycotoxines(DON).

Abstract

Study of Bacterial Antagonism in the Bio-control of Some Phytopathogenic Fungi:

Biological control becomes a promising alternative to reduce the effect of chemical products (pesticides, including soil pollution) which has caused serious problems on the environment and the health of the consumer, in this perspective our work focuses on the study of the in-vitro and in-vivo antagonist potential of some rhizospheric strains against phytopathogenic fungi affecting forage crops.

In our work we have made a synthesis from the two articles on the use of rhizobacteria in the biocontrol of diseases affecting maize in different regions of the world.

In the first article, the bacterial strains used are *Bacillus subtilis* against plant pathogens of the *Fusarium* genus in two media PDA and TSA. These strains showed inhibition rates ranging from 11.66% to 58.33%. In addition to in vitro antagonism test, the authors of this article make other experiments concerning the study of the antagonistic effect on the number and germination of spores, the study of the effects of volatile compounds secreted by the bacterium antagonist and also a study concerning the in vivo antagonism test and as a result the strain which showed great effectiveness against the inhibition of mycelial growth is the SR-146 strain by a rate of 58%.

In the second article, the rhizobacteria of the genera *Bacillus* and *Pseudomonas* tested showed different levels of inhibition of the in vitro mycelial growth of *Colletotrichum graminicola*. Rhizobacterium P23, of the genus *Pseudomonas*, caused greater inhibition in vitro at a rate of 34.32% against *C. graminicola*, showing potential for use in future biological control programs against maize leaf anthracnose.

These results indicate that the biocontrol makes the plant tolerant to the disease by strongly reducing the evolution and by delaying the appearance of the symptoms, than the total inhibition of the onset of the latter.

Keywords: Rhizospheric bacteria Antagonism, forage crops, biocontrol, corn, phytopathogenic fungi, mycotoxins (DON).

ملخص

دراسة العداء البكتيري في المكافحة الحيوية لبعض الفطريات الممرضة للنبات:

تصبح المكافحة البيولوجية بديلاً واعدًا للحد من تأثير المنتجات الكيميائية (المبيدات الحشرية ، بما في ذلك تلوث التربة) التي تسببت في مشاكل خطيرة على البيئة وصحة المستهلك ، ومن هذا المنظور يركز عملنا على دراسة المختبر و القدرة المضادة في الجسم الحي لبعض سلالات الريسوسفير ضد الفطريات الممرضة للنبات التي تؤثر على محاصيل العلف.

في عملنا ، قمنا بعمل توليفة من المادتين حول استخدام البكتيريا الجذرية في المكافحة الحيوية للأمراض التي تصيب الذرة في مناطق مختلفة من العالم.

في المقالة الأولى ، السلالات البكتيرية المستخدمة هي *Bacillus subtilis* ضد مسببات الأمراض النباتية من جنس *Fusarium* في اثنين من الوسائط PDA و TSA. أظهرت هذه السلالات معدلات تثبيط تراوحت من 11.66٪ إلى 58.33٪. بالإضافة إلى اختبار العداء في المختبر ، يقوم مؤلفو هذه المقالة بإجراء تجارب أخرى تتعلق بدراسة التأثير العدائي على عدد وإنبات الجراثيم ، ودراسة آثار المركبات المتطايرة التي يفرزها مضاد البكتيريا وأيضاً دراسة تتعلق بـ في اختبار العداء في الجسم الحي ونتيجة لذلك فإن السلالة التي أظهرت فعالية كبيرة ضد تثبيط نمو الفطريات هي سلالة SR-146 بنسبة 58٪.

في المقال الثاني ، أظهرت البكتيريا الجذرية من جنس العصوية و *Pseudomonas* مستويات مختلفة من تثبيط النمو الفطري في المختبر من *Colletotrichum graminicola* تسبب بكتيريا *Rhizobacterium P23* ، من جنس *Pseudomonas* ، في تثبيط أكبر في المختبر بمعدل 34.32 ٪ ضد *C. graminicola* ، مما يدل على إمكانية استخدامها في برامج المكافحة البيولوجية المستقبلية ضد أنثراكنوز أوراق الذرة.

تشير هذه النتائج إلى أن المكافحة الحيوية تجعل النبات يتحمل المرض عن طريق الحد بشدة من التطور وعن طريق تأخير ظهور الأعراض ، من التثبيط التام لظهور الأخير.

الكلمات المفتاحية: عداء بكتيريا الغلاف الجذور ، محاصيل الأعلاف ، المكافحة الحيوية ، الذرة ، الفطريات الممرضة للنبات ، السموم الفطرية (DON)

Table des matières

Remerciement	
Dédicace	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Table des matières	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	
Chapitre I : les cultures fourragères	3
1 Généralités	3
1.1 Les graminées	3
1.1.1 Principaux stades de développement des graminées	4
1.1.2 Quelques exemples des graminées	5
1.2 Les légumineuses	7
1.2.1 Principaux stade de développement des légumineuses	8
1.2.2 Quelques exemples de légumineuses	9
2 Les maladies des cultures fourragères et les moyenne de lutte	11
2.1 Les maladies d'origine phytopathogène	11
2.1.1 Maladies d'origine virales	11
2.1.2 Maladies d'origine bactériennes	11
2.1.3 Maladies fongiques	11
2.1.4 Exemples des principales maladies fongiques menacent les cultures fourragères	18
2.2 Les moyennes de lutte	21
2.2.1 La lutte culturale	21
2.2.2 La lutte physique	21
2.2.3 La lutte chimique	22
2.2.4 La lutte génétique	22
2.2.5 Lutte intégrée	23
2.2.6 Lutte biologique	23
Chapitre II : les Rhizobactéries Bénéfiques	25
1 Généralités	25
2 La diversité des PGPR	25
2.1 Firmicutes	26
2.2 Actinobacteria	26

2.3	Bacteroidetes	27
2.4	Proteobacteria	27
	a) Les Alphaproteobacteria	28
	b) Les Betaproteobacteria	28
	c) Les Gammaproteobacteria	28
3	Effets des PGPR sur le développement des plantes	30
3.1	Action directe :	32
3.1.1	La résistance systémique induite	32
3.1.2	Production des phytohormones	33
3.1.3	Solubilisation du phosphate	34
3.1.4	Solubilisation du potassium	34
3.1.5	Production des enzymes lytiques	35
3.2	Action indirecte	35
3.2.1	Inhibition des bioagresseurs par compétition	35
3.2.2	L'Antibiose	37
4	Formulation	39
	Matériels et Méthode	41
	Présentation du travail	43
1	Matériels	44
1.1	Matériels non biologiques	44
1.2	Matériels biologiques	44
	Dans l'ensemble des travaux (l'article 01 et l'article 02) les microorganismes utilisés sont présents dans le tableau 05	44
2	Méthodes	45
2.1	Isolement des microorganismes pathogènes	45
	➤ Article 01	45
	➤ Article 02	49
2.2	Test d'antagonisme <i>in vitro</i>	50
	➤ Article 01	50
2.3	Effet de l'antagoniste sur le nombre et la germination des spores	52
2.4	Détection des composés volatils susceptibles d'être sécrétés par les bactéries antagonistes	52
2.5	Effet des fractions extra et intracellulaire bactériennes sur la croissance mycélienne des espèces fongique	53
2.6	Test d'antagonisme <i>in vivo</i> sur des épis de Maïs	54
2.7	Dosage des mycotoxines dans des grains infestés	56

2.8	Analyse statistique	58
	Résultats Et Discussions	59
1	Résultats d'isolement des microorganismes pathogènes :	59
2	Résultats d'antagonisme <i>in vitro</i>	64
3	Les résultats des autres expériences qui sont fait par les auteurs de l'article 1	66
3.1	Effet de l'antagoniste sur le nombre et la germination des spores	66
3.2	Effet des composés volatils secrétés par les bactéries antagonistes	68
3.3	Test d'antagonisme <i>in vivo</i> sur des épis de maïs	70
3.4	Dosage du déoxynivalenol (DON) dans des grains infestés	71
4	Résultats de l'antagonisme <i>in vitro</i> de l'article 2	72
	Conclusion	74
	Références bibliographiques	
	Annexes	

Liste des figures

Figure 1: la morphologie des graminées	4
Figure 2: Principaux stades de développement des graminées	5
Figure 3: le sorgho fourrager	6
Figure 4: l'avoine	6
Figure 5: Le Maïs	7
Figure 6: la morphologie des légumineuses(petit pois)	8
Figure 7: Principaux stade de développement des légumineuses	9
Figure 8: la Luzerne	9
Figure 9: Le Bersim ou trèfle d'Alexandrie	10
Figure 10: Le Sainfoin	10
Figure 11: jaunissement des feuilles de la luzerne.	12
Figure 12: Mosaique jaune du trèfle.	12
Figure 13: Mosaique modéré de l'orge.	12
Figure 14: jaunissement des feuilles de Colza.	13
Figure 15: flétrissement bactérienne de maïs.	13
Figure 16: brûleur bactérienne de soja.	13
Figure 17: les raies bactériennes sur le Sorgo.	14
Figure 18: flétrissement verticillien sur les tiges et les feuilles de luzerne.	15
Figure 19: flétrissement d'un groupe de pieds de luzerne.	15
Figure 20: Des tâches circulaires jaunes ou orange concentriques sur les feuilles du trèfle.	15
Figure 21 : anthracnose sur les feuilles de maïs.	16
Figure 22: phoma sur les tiges de la luzerne.	16
Figure 23: pourriture des racines et ou du collet.	16
Figure 24: alternaria alternata sur les feuilles et les tiges du colza.	17
Figure 25: Pourriture molle du soja.	17
Figure 26: Alternaria alternata sur feuilles,les tiges et les fruits de colza	18
Figure 27 : Symptômes de Verticillium albo- atrum sur feuille de colza	19
Figure 28: Fusarium oxysporum sur les collets, des feuilles et les plantes	20
Figure 29 : Bacillus subtilus sous le microscope électronique * 50.000	26
Figure 30 : Pseudomonas fluorescens et Pseudomonas Putida dans des boites du pétri	30
Figure 31 : Effets des PGPR sur le développement des plantes	31

Figure 32 : Carte de la Tunisie montrant la répartition des champs infestés sur différentes régions climatiques (Bortoli et al.,1969)	46
Figure 33 : Méthode de confrontation directe en boîte de pétri entre les souches bactériennes et l'agent phytopathogènes	51
Figure 34 : le montage expérimental qui est effectuée pour détecter les composé volatiles	53
Figure 35 : prélèvement des disques mycéliens	58
Figure 36 : Méthodes d'ensemencement des souches	58
Figure 37 : la forme des conidies du <i>Fusarium pseudograminearum</i>	60
Figure 38 : la forme des conidies du <i>Fusarium culmorum</i>	61
Figure 39 : Amplification de l'ADN de quatre isolats de <i>Fusarium pseudograminearum</i> .piste m : marqueur de taille de 100 pb (invitrogen, carls-bad, États-Unis) : pistes 1-4 amplifiée avec l'ensemble d'amorces FP1-1/FP1-2 <i>Fusarium pseudo</i> spécifique, 523 pb de paire	62
Figure 40 : la forme des conidies de <i>colletotrichum graminicola</i>	64
Figure 41 : Test d'antagonisme direct in vitro	64
Figure 42 : Effets des bactéries antagonistes sur la croissance mycéliennes des deux espèces de <i>Fusarium</i> sur les milieux de culture PDA et TSA. Avec C1 : <i>F.culmorum</i> , G2 : <i>F.pseudograminearum</i> .	65
Figure 43 : Observation microscopique montrant l'effet des bactéries antagonistes sur la germination des spores des deux espèces de <i>Fusarium</i> après 24h d'incubation	67
Figure 44 : Effet des antagonistes bactériennes sur la croissance mycélienne des isolats <i>F.culmorum</i> (C1) et <i>F.pseudograminearum</i> (G2) (des souches : M1-20, K1-11).	68
Figure 45 : Effet des antagonistes bactériennes sur la croissance mycélienne des isolats <i>F.culmorum</i> (C1) et <i>F.pseudograminearum</i> (G2) (des souches : J9, SR46).	69
Figure 46 : Effet des bactéries antagonistes sur la fusariose d'épi de maïs in vivo	70
Figure 47 : Effet des bactéries antagonistes sur la fusariose du Maïs.	71
Figure 48 : Croissance mycélienne de <i>Colletotricum graminicola</i> en présence de rhizobactéries	72
Figure 49 : Indice de vitesse de croissance mycélienne (IVCM) de <i>Colletotricum graminicola</i> en présence de rhizobactéries.	73

Liste des tableaux

Tableau 01: principale maladies virales _____	12
Tableau 2: principales maladies bactérienne _____	13
Tableau 3: principales maladies fongiques _____	15
Tableau 4: les fonctions des métabolites secondaires. _____	24
Tableau 5 : Matériels biologiques _____	44
Tableau 6 : les champs prospectés dans les quatre climats de la région du nord de la Tunisie d'où ont été prélevés les échantillons à analyser. _____	45
Tableau 7 : Espèces - amorces spécifiques utilisées pour identifier les espèces de Fusarium	48
Tableau 8 : Répartition de la fusariose de l'épi dans les régions climatiques prospectées	59
Tableau 9 : Espèces contaminants exprimées en pourcentage du nombre total d'espèces isolées et en pourcentage des champs contenant l'isolat _____	62

Liste des abréviations

PGPR	Plant Growth-Promoting Rhizobacteria
RSA	Résistance systémique acquise
PR	des gènes de défense
JA	l'acide jasmonique
ET	l'éthylène
SOD	superoxyde dismutase
CAT	catalase
APX	scorbate peroxydase
RSI	résistance systémique induite
DAPG	diacétylphloroglucinol
HCN	cyanure d'hydrogène
ABA	L'acide abscisique
GA	les gibbérellines
CK	Les cytokinines
AIA	acide indolylacétique
ACC	Aminocyclopropane-1-carboxylate
NH₃	l'ammoniac
N₂	Le diazote
Fe²⁺	l'ion ferreux
Fe³⁺	l'ion ferrique
FHB	<i>Fusarium</i> head blight (Fusariose de l'épi)

Introduction

La conduite de l'alimentation de bétail doit leur assurer des apports nutritionnels en énergie, en matières azotées, en minéraux et en vitamines correspondant à leurs besoins, tant pour leur entretien et leurs déplacements, que pour leur production (croissance et production de viande, gestation, production de lait, de cuir, de laine, de travail, etc.).

L'alimentation du bétail se caractérise notamment par une offre insuffisante en ressources fourragères ce qui se traduit par un déficit fourrager estimé à 34% par **Houmani (1999)**. Les éleveurs sont alors contraints de se rabattre sur des fourrages de moindre qualité mais surtout d'utiliser les concentrés d'une manière abusive. Parmi les paramètres qui diminuent la qualité du fourrage, il y a les maladies de ces cultures causent par des microorganismes (virus, bactéries, champignons) (**ZIM, 1986**), ces maladies réduisent de façon importante la productivité des cultures dans le monde entier, causant des pertes économiques importantes. Donc pour satisfaire le marché national dans l'aliment frais de bétail et encourager la production et l'élevage, il faut de voir un peu l'aspect protection des cultures fourragères par des moyens biologiques (**Rome, 1999**).

La lutte biologique par des micro-organismes se présente comme une alternative intelligente pour la réduction ou l'élimination de l'utilisation de produits agrochimiques dans le contrôle des maladies phytopathogènes et parmi les agents possibles de lutte biologique, se distinguent les rhizobactéries, qui se trouvent naturellement en grande diversité dans le sol et qui ont une activité antagoniste contre d'autres composants de la communauté microbienne (**Ghini et Nakamura, 2001**). Depuis quelques décennies, certains types de rhizobactéries « PGPR, plant growth promoting rhizobacteria » sont présentés comme des agents potentiellement phytobénéfiques, assurant à la fois la phytostimulation de la croissance végétale (**Kloepper et al. ; 1980 Silva ; et al, 2006**) **Benchabane et al., 2013; Sivasakthi et al., 2014; Novo et al 2018**), et la bioprotection des plantes vis-à-vis de nombreuses pathologies végétales (**Ongena et al, 2005, Figueroa Lopez et al., 2017**) et l'induction et le renforcement des capacités défensives et de résistance chez les plantes (**Ramette et al. 2003; Lemanceau et al., 2014**). Compte tenu de leur intérêt biotechnologique, pour leurs effets bénéfiques en agriculture et leur impact sur l'environnement, les PGPR fait l'objet de nombreux travaux (**Lemanceau, 1992**). Outre le métabolisme basal ou primaire de ces rhizobactéries, nécessaire à leur fonctionnement physiologique, leur métabolisme secondaire joue un rôle de première importance dans les mécanismes associés à leurs effets bénéfiques sur la plante. Cette production de métabolites secondaires doit être associée à un pouvoir de colonisation rhizosphérique et d'adaptation aux variations physico-chimiques et biologiques de la

rhizosphère, la compétitivité rhizosphérique, est un critère indispensable dans le choix de souches utilisables comme biopesticides et/ou biofertilisants.

La compréhension des mécanismes d'action et des conditions permettant l'optimisation des effets bénéfiques de ces rhizobactéries constitue une voie indispensable pour leur exploitation dans les pratiques agronomiques comme biopesticides et/ou biofertilisants, afin de diminuer la dépendance excessive des intrants chimiques dont les effets négatifs sur la santé et l'environnement ne sont plus à démontrer.

Même si l'utilisation des PGPR reste limitée, des formulations à base de ces souches ont été mises sur le marché des biopesticides, malgré la difficulté de leur application. Les effets bénéfiques des PGPR saprophytes rhizosphériques sont associés à leurs activités antagonistes à l'encontre des agents pathogènes et/ou délétères évoluant à proximité des racines, leur participation dans l'amélioration de l'alimentation de la plante, notamment en fer et en phosphore, leur aptitude à produire des composés analogues aux phytohormones et leur capacité d'induction systémique de mécanismes de résistance chez la plante (**Lemanceau, 1992; Voisard et al., 1994; Delorme, 2002; Latour et al., 2003; Bakker et al., 2003**).

Dans notre travail, on va traiter et analyser des articles parlant de la recherche de bactéries antagonistes capables d'inhiber la croissance du pathogène, ainsi que le développement de la maladie A travers l'analyse des deux articles :

"Bio-suppression de la fusariose du Maïs et réduction des mycotoxines DON par des bactéries antagonistes du genre *Bacillus* ".

"Bio contrôle in vitro de *colletotrichum graminicola*, agent de l'antracnose foliaire du Maïs".

Nous allons voir l'effet de rhizobactéries antagonistes dans le bio contrôle des deux agents fongiques provoquant les maladies de la fusariose et l'antracnose de Maïs, pour cela le travail repartis à une analyse bibliographique, un matériels et méthodes, résultats et discussion et en termine par une conclusion et perspectives.

Données Bibliographiques

Chapitre I : les cultures fourragères

1 Généralités :

Le terme « fourrage » désigne tout végétal (les parties vertes et leur débris) destinés à l'alimentation des animaux (**Planquaert, 1977**). Ce dernier peut être consommé soit à l'état frais soit à l'état sec ou bien sous forme fermenté (ensilage) (**Renaud, 2002**). Généralement, les espèces existantes peuvent être sauvage (naturel) ou cultivé (**Boudet, 1975**). Les espèces les plus utilisés dans l'alimentation du bétail appartiennent soit aux graminées, soit aux légumineuses. En plus de ces deux famille (graminées et légumineuse) on peut avoir des arbres ; des arbustes ; et des buissons (**Schnell ,1972**). Il est a constaté que les espèces fourragère appartenant aux graminées sont moins dominantes et moins diversifiées para port aux légumineuses (**Fournier et al, 2001**).

1.1 Les graminées :

La famille des graminées (ou Poaceae) a une place assez importante dans l'alimentation de l'homme (céréale), elle est aussi utilisée comme aliment de base chez le bétail (**Soreng et al, 2015**) Effectivement elle est très riche en énergie, en azote, en amidon, et en minéraux qui sont facilement exploitable par les animaux (**Klein ,2014**). Morphologiquement, c'est une plante monocotylédone caractérisée par des racines fasciculées à partir du collet, des tiges composées de nœuds, d'entrenœuds, de feuilles formant une gaine et des fleurs qui sont très petites et très nombreuses (Figure 1) (**Dallwitz, 2009**). Agronomiquement les graminées conviennent à une grande variété de sols et s'adaptent à des sols plus lourds, argileux et mal drainés ou à des sols sableux (**Pancho, 2017**), secs et stériles. Les graminées ornementales de climat chaud débutent leur croissance à la fin du printemps et fleurissent à la fin de l'été et à l'automne. Une très grande majorité des graminées aime le plein soleil et des sols bien drainés pour se développer. C'est le cas des fétuques, des Pennisetum, des Molinia, les Carex, les Miscanthus et Panicum et bien d'autres espèces (**Pierre P, 2003**). Ces graminées-là peuvent nuire à la santé de l'homme et de l'animale quand elles sont contaminées par certains agents phytopathogène (**Lydie, 2010**).

La familles des graminées composées d'environ 9700 espèces connus sont répartir sur toute la planète et peuvent être soit annuel ou vivace, selon la durée du cycle de développement :

-Les annuelles : qui ne se développent qu'au cours de la saison des pluies et ensuite la plante entière se dessèche et meurt (**l'Ontario, 2009**).

-Les vivaces (ou pérennes) : rencontrées surtout dans les zones tropicales, ils sont caractérisée par leur persistance durant plusieurs années consécutives grâce à leurs racines et leurs bourgeons latéraux (Klein et al. 2014).

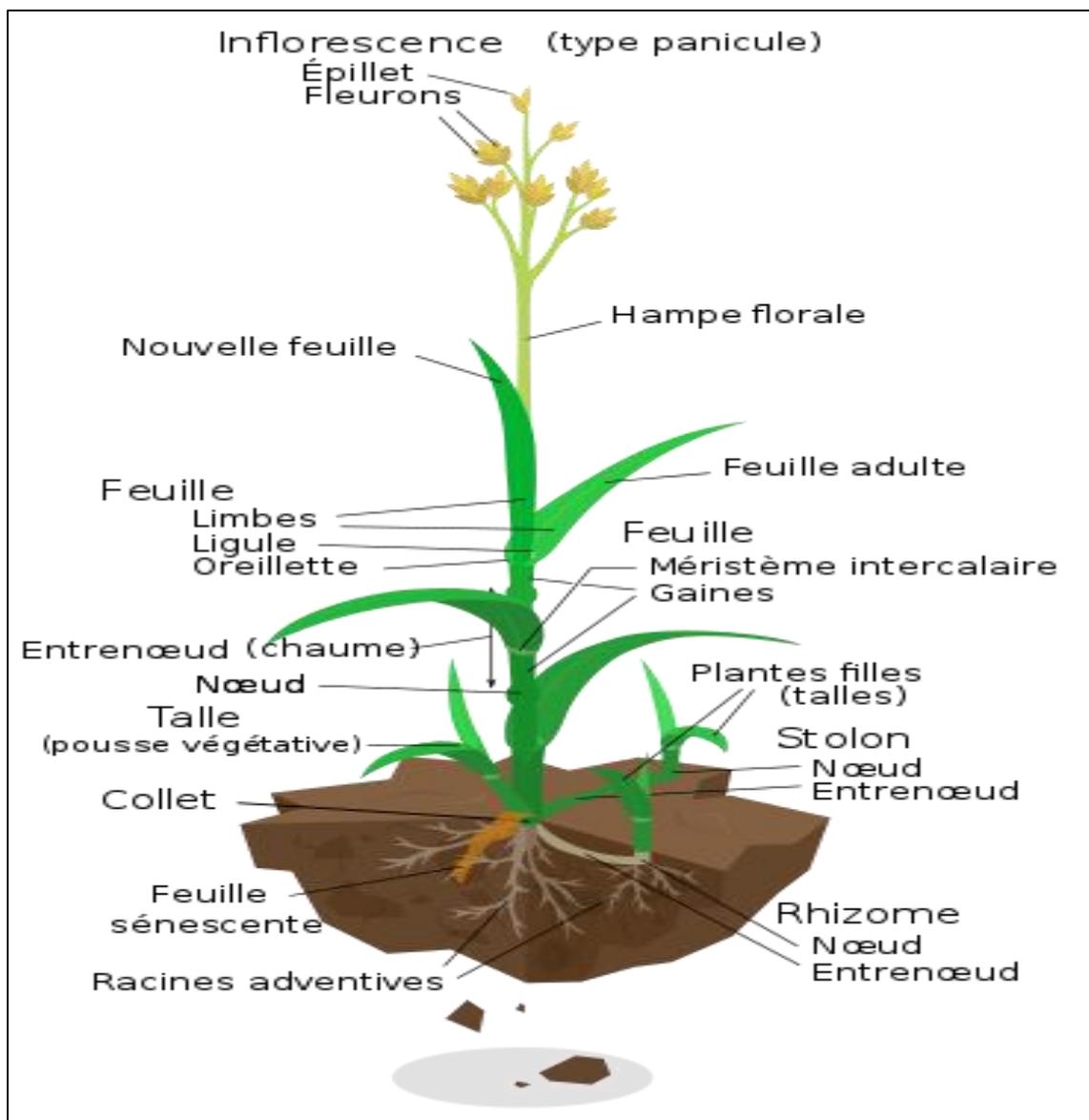


Figure 1: la morphologie des graminées (Barnh, 1895)

1.1.1 Principaux stades de développement des graminées :

Le développement des graminées passe par plusieurs stades (Jean Et Bruno ,2015)

(Figure 2):

- 1- **Stade Tallage et feuillu** : dans ce stade, on observe une production de feuilles et de bourgeons foliaires qui s'associe à l'émission des racines. Ces feuilles sont très riche en sucres solubles, cellulose (fibres), protéines, et en énergie ce qui va satisfaire les principaux besoins de l'alimentation du bétail.

- 2- **Stade Montaison** : ce stade est caractérisé par l'augmentation globale de la taille de plante parce qu'on va avoir un allongement des tiges, un développement de la feuille qui va devenir très riche en fibre et en cellulose, L'apparition des ébauches florales, le début de formation de la graine.
- 3- **Stade Epi à 10 cm** : dans ce stade, la longueur de tige atteint les 10 cm.
- 4- **Stade début Epiaison** : dans ce stade il y a apparition des premiers épis.
- 5- **Stade pleine Epiaison** : dans ce stade ,50% des épis sont formé.
- 6- **Stade Floraison** : dans ce stade, les étamines qui forment la fleur apparaissent, la plante est dans sa meilleur richesse en cellulose, en fibre, en azote, en minéraux, en énergie ce qui va satisfaire les besoins de l'alimentation du bétail.

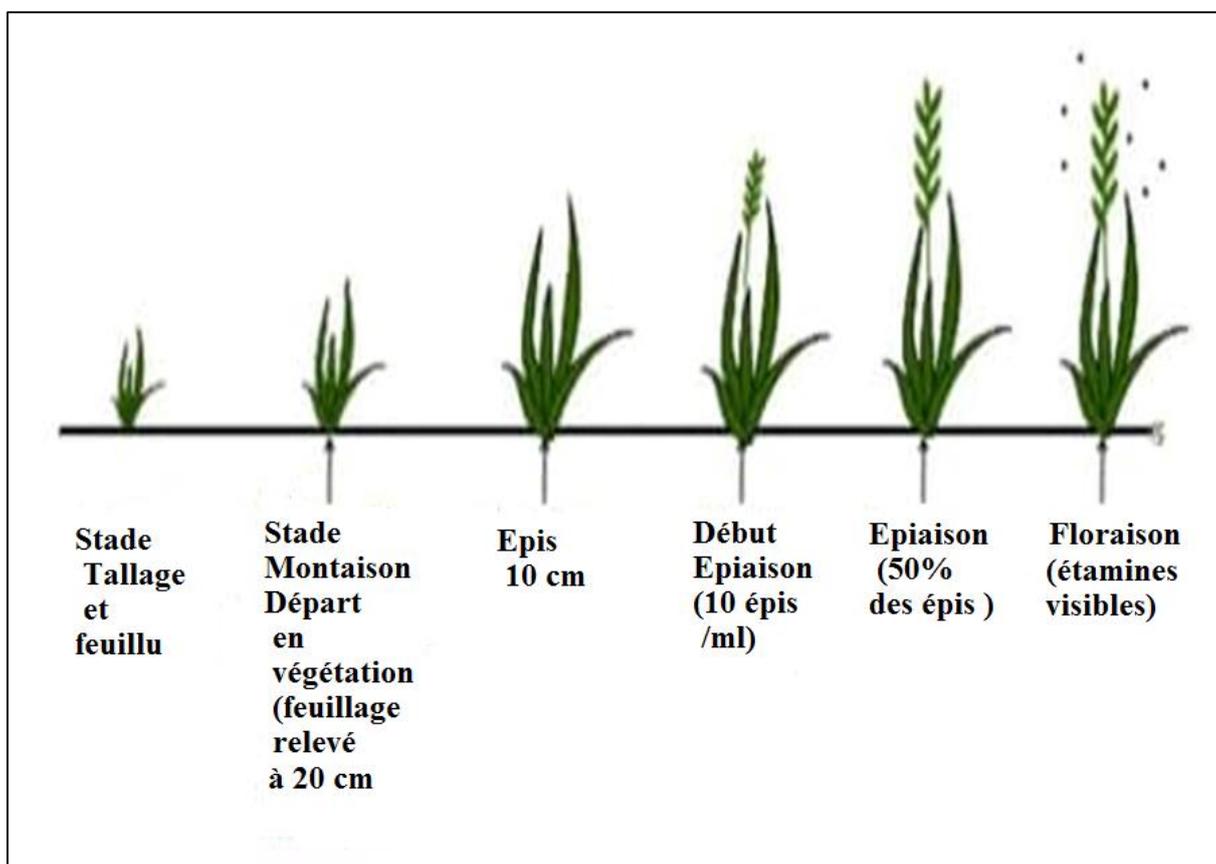


Figure 2: Principaux stades de développement des graminées (kerbal, 2020)

1.1.2 Quelques exemples des graminées :

- **Le Sorgho Fourrager (figure 03)** : est une graminée riche en amidon, en fibres alimentaires, en protéines, et aussi en minéraux tels que le fer, le calcium et le phosphore (Emile et al 2006).la conduite de sa culture est facile, il a des besoins très faible en

eau(Legarto, 2000)ce qui le classe comme une plante résistante au stress hydrique et elle est peu exigeante de point de vue besoins nutritives (vilaine, 2018).



Figure 3: le sorgho fourrager (Semental ,2003).

• **L’avoine (Figure 04) :** c'est une graminée riche en lipides, particulièrement en acides gras, en glucides particulièrement (les fibres alimentaires et le gluten), en minéraux tel que le fer, le calcium, le phosphore, le magnésium et en vitamines ... (Zubiria ,2021). L’avoine à une faible teneur en protéine donc il est à constater que pour améliorer la teneur de ce fourrage en protéine, en peut la mélanger avec une légumineuse (comme la vesce) (Eleanor, 2014).



Figure 4: l’avoine (Futura-Sciences, 2022).

• **Le Maïs (Figure 05) :** est une graminée riche en flavonoïdes (Siyuan, 2018), en caroténoïdes (Muzhingi, 2008) et en vanilline, ainsi qu’en acides (phénoliques, vanillique, protocatéchuique, férulique, p-coumarique) (Gonzales-Munoz, 2013). Pour le bétail, le maïs est donné comme un additifs alimentaires ou comme un enrichissement avec une autres espèce parce que il ne contient pas le sucre donc en peut pas le considérer comme un aliment principale (Karger,1972).Malheureusement la culture en elle-même, bien qu’elle est intéressante mais elle est limité par le fait qu’elle a un fort besoin en eau, ce qui la rend un peu difficile a cultivé dans les zones pastorales (Bernard, 1999).



Figure 5: Le Maïs (Rouf, 2016).

1.2 Les légumineuses :

Les légumineuses (ou fabacées) sont un groupe botanique à grand intérêt économique, il renferme des espèces alimentaires (pois, fèves, haricots), des espèces ornemental (arbre de Judée) et des espèces fourrager (luzerne, trèfle, sainfoin) (Grillot, 1954) qui sont utilisée dans l'alimentation du bétail car elles sont riches en sources, de protéines, en fibres et en énergie (Vance et al. 2000).

Morphologiquement (Figure 6), les légumineuses sont des plantes dicotylédone caractérisée par des racines ayant une propriété essentielle, celle de fixer l'azote atmosphérique de l'air en formant des nodosités grâce à des bactéries du genre *Rhizobium*, par des tiges bien développé, par des rameaux prolongés en ailes membraneuses et par des fruits sous forme d'une gousse aplatie (Anna et al, 2015). Les légumineuses sont riches en protéines, en matières azotées digestibles (Cesar et, al. 2004) en lipides, en éléments minéraux tels que le fer le calcium, le potassium, le magnésium, le phosphore, le soufre, le cuivre, le manganèse, en vitamines et en matière organique (Köpke et Nemecek, 2010 ; Chianu et al, 2011 ; Lupwayi et al, 2011 ; Mahieu et al, 2011).

Agronomiquement, les légumineuses poussent mieux en zone ensoleillée, et elles sont sensibles au gel. Une fève fraîche peut être récoltée après environ 55 jours, alors que pour des légumineuses séchées, il en prend de 80 à 100 jours, selon le climat et la température (humide ou sèche). La partie la plus compliquée de la culture de légumineuses est le séchage (Hadroug, 2019).

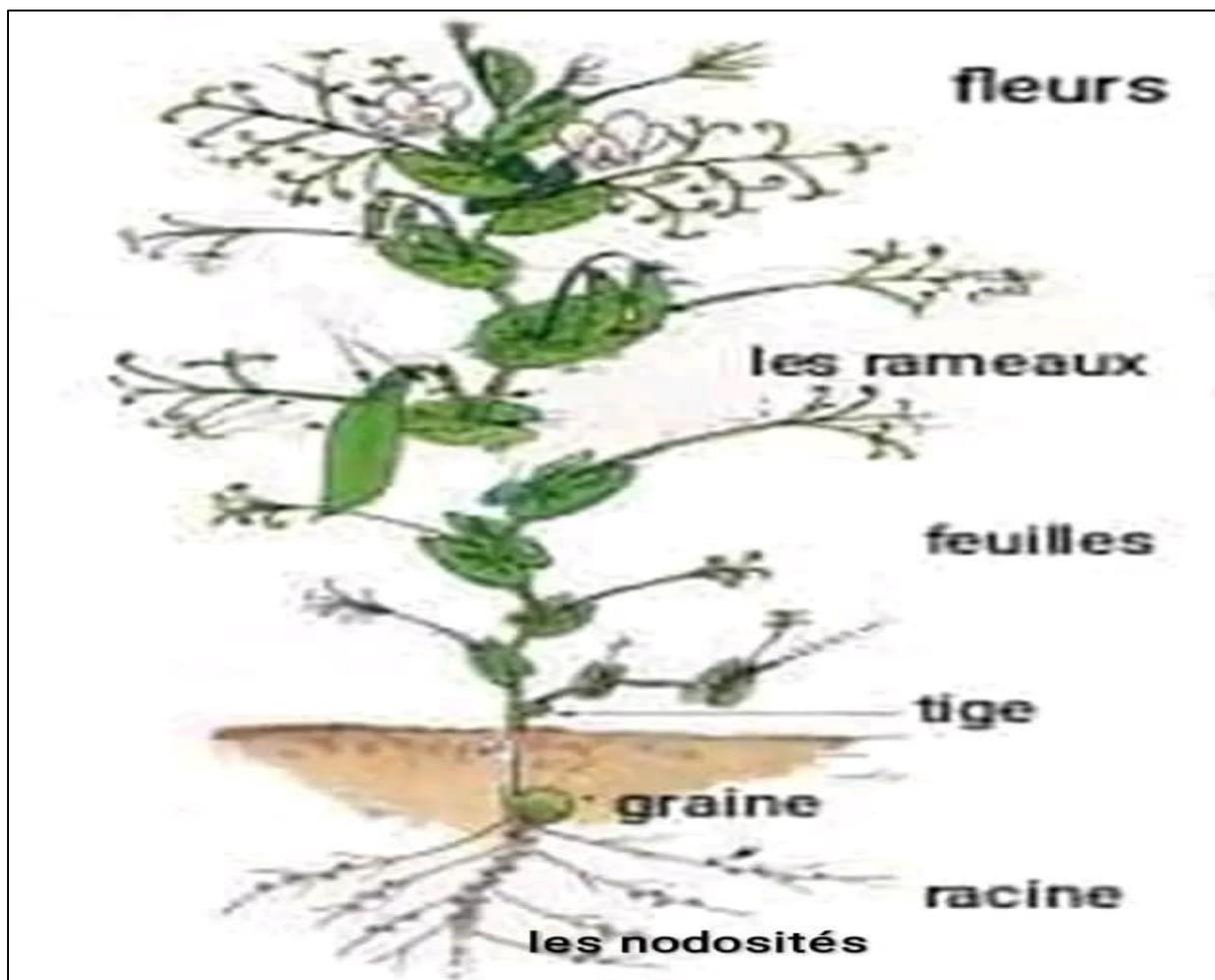


Figure 6: la morphologie des légumineuses (petit pois) (Anna et al, 2015).

1.2.1 Principaux stade de développement des légumineuses :

Le développement des légumineuses passe par plusieurs stades (Labbe, 2004) (Figure 07) :

- 1- **Stade Végétatif** : dans ce stade, il y a une absence totale des boutons floraux.
- 2- **Stade Initiation** : dans ce stade, 10 tiges sur 20 sont initiées, on peut sentir le bouton floral sous les doigts en saisissant l'extrémité d'une tige.
- 3- **Stade Début Bourgeonnement** : dans ce stade, 4 tiges sur 20 présentent une inflorescence visible sans dissection (ont des boutons floraux.), inflorescences compactes visibles \geq ou $=$ à 10 mm.
- 4- **Stade Bourgeonnement** : dans ce stade, 16 tiges sur 20 présentent une inflorescence visible, des boutons floraux, inflorescences compactes sont visibles \geq ou $=$ à 10 mm.
- 5- **Stade Début Floraison** : dans ce stade, 10 tiges sur 20 présentent une inflorescence violette (elles ont des fleurs épanouies).

6- **Stade Floraison** : dans ce stade, 16 tiges sur 20 ont des fleurs épanouies, 16 tiges sur 20 fleuries (ayant au moins une fleur sur l'inflorescence) (Vignau-Loustau ,2005).

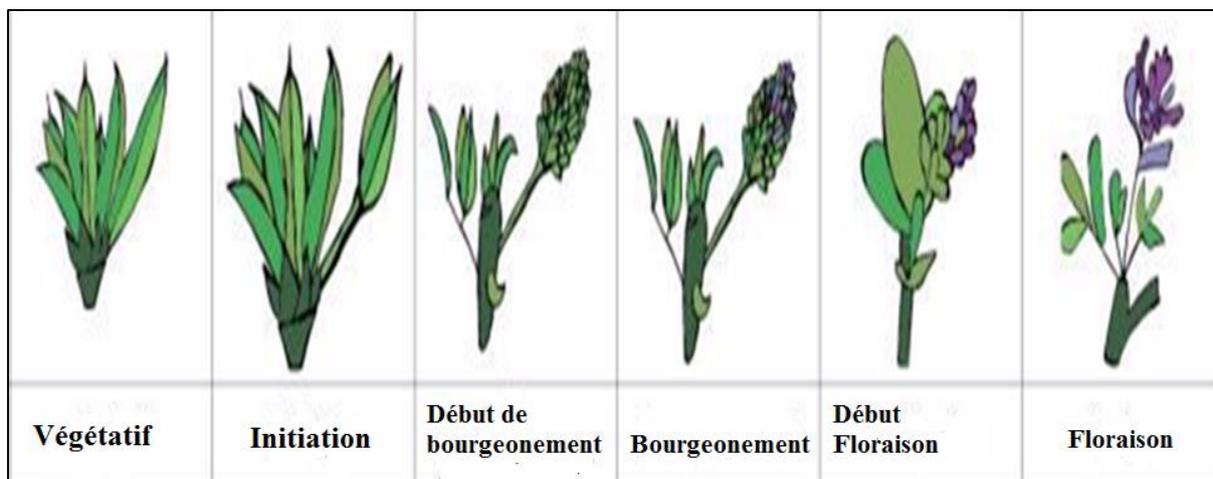


Figure 7: Principaux stade de développement des légumineuses (Labbe, 2004).

1.2.2 Quelques exemples de légumineuses :

- **la Luzerne (Figure 8)** : est une légumineuse riche en protéines car elle contient 15 à 25 % de matières azotées (Jean Et Bruno, 2015), En vitamines A, C et D et en plusieurs éléments minéraux tels que le calcium, potassium, magnésium, fer, phosphore, soufre, cuivre, manganèse, acide folique... (Estelle B.2017).



Figure 8: la Luzerne (François, 2015).

- **Le Bersim ou trèfle d'Alexandrie (Figure 9)** : est une légumineuse très riche en eau, en matières azotées (Lapeyronie, 1982), En glucides solubles et insolubles, en éléments minéraux (calcium, magnésium, phosphore, potassium ...), en oligo-éléments (chrome, bore, cobalt, cuivre, fer, zinc, sélénium ...) et en vitamine (C, E, K, groupe B). Il contient également des tanins, des acides organiques et des pigments. (Alane, 2007).



Figure 9: Le Bersim ou trèfle d'Alexandrie (Chadoulia, 1991).

•**Le Sainfoin (Figure 10)** : est une légumineuse riche en protéines, en azote, en tanins, en énergie, très digestible. Elle résiste très bien au froid et à la sécheresse. C'est la légumineuse des sols calcaires, sec et en grande altitude. Il ne nécessite pas d'apport d'engrais azoté pour sa culture (Arrigo, 2008).



Figure 10: Le Sainfoin (Vassilcz ; 2019).

2 Les maladies des cultures fourragères et les moyenne de lutte :

Les cultures fourragère comme toutes autres cultures peuvent présenter des symptômes qui sont causée par des facteurs abiotiques tel que les carences en élément, le gel, la sécheresse, stress hydrique, stress thermique et par des facteurs biotique tel que les insectes, les nématodes et des microorganismes, ces dernières généralement sont assez diversifiés, on peut avoir des virus ,des bactéries et des champignons ce qui peut causer des conséquence assez grave directement sur la qualité et sur le rendement des culture, et donc va influencer la disponibilité de la production pour l'alimentation du bétail.

2.1 Les maladies d'origine phytopathogène :

2.1.1 Maladies d'origine virales :

La pression des attaques par ces agents viraux fait en sorte de réduire la production et la qualité des fourrages. Les principales maladies d'origine virale qui affecte les cultures fourragères sont résumées dans le tableau n°01.

2.1.2 Maladies d'origine bactériennes :

La pression des attaques par ces agents bactériennes fait en sorte de réduire la production et la qualité des fourrages. Les principales maladies d'origine bactériennes qui affectent les cultures fourragères sont résumées dans le tableau n°02.

2.1.3 Maladies fongiques :

Les champignons phytopathogène réduisent de façon importante la productivité des cultures dans le monde entier, causant des pertes économiques importantes (**prapagdee et al, 2008**). Les principales maladies d'origine fongiques qui affectent les cultures fourragères sont résumées dans le tableau n°03.

Tableau 01: principale maladies virales

Maladie et plante hôte	Agent pathogènes	Organe touché	symptômes	Source	image
Mosaïque de la luzerne transmise par certains pucerons, par les graines ou par le pollen vers les graines (Laforest, 2004).	Virus de la mosaïque de la luzerne AMV (<i>alfalfae mosaic virus</i>).	les feuilles.	- des taches de couleur jaunâtre à blanchâtre à cause de la destruction des chloroplastes.	(Freeman A ,2006).	 <p>Figure 11: jaunissement des feuilles de la luzerne.</p>
Mosaïque jaune du trèfle transmis par les pucerons et par la graine.	<i>Clover yellow mosaic virus.</i>	les feuilles.	jaunissement des feuilles.	(Michel Courtillot, 1989).	 <p>Figure 12: Mosaïque jaune du trèfle.</p>
Mosaïque modéré de l'orge transmise par le champignon <i>Polymyxa graminis</i> .	<i>VMMO</i> (virus de la Mosaïque modéré de l'orge).	les feuilles.	-jaunissement. -enroulement des feuilles.	(Bennofoy ; 2013).	 <p>Figure 13: Mosaïque modéré de l'orge.</p>

Tableau 2: principales maladies bactérienne

maladie	Agent pathogènes	Organe touché	symptômes	Source	Image
jaunissement des feuilles.	<i>Xanthomonas campestris</i> .	Feuilles.	- taches brun jaunâtres. - dessèchement des feuilles.	Getter, K. 2012.	 Figure 14: jaunissement des feuilles de Colza.
Flétrissement bactérien du maïs.	<i>Pantoea stewartii</i> ou <i>Erwinia stewartii</i> .	- Feuilles. - Tige.	-bandes longues ou courtes, irrégulières, vert pâle ou jaunes. -flétrissement de la plante.	(Patrick, 2013).	 Figure 15: flétrissement bactérien de maïs.
Brûlure bactérienne du soja.	<i>Pseudomonas savastanoi pv. glycinea</i>	- feuille. - les gousses.	-Petites taches jaunes ou brunes sur les feuilles -Un "halo" vert jaunâtre. -Des lésions apparaissent également sur les gousses.	(Hartman, 1999).	 Figure 16: brûlure bactérienne de soja.

<p>La maladie des raies bactériennes du sorgho.</p>	<p><i>Pseudomonas andropogoni.</i></p>	<p>- feuille.</p>	<p>-de longues stries ou raies internervaires, s'élargissent mais restent délimitées par les nervures.</p>	<p>(Blogueur, 2019).</p>	 <p>Figure 17: les raies bactériennes sur le Sorgho.</p>
---	--	-------------------	--	---------------------------------	--

Suite de tableau 02 : principale maladies bactériennes

Tableau 3: principales maladies fongiques

maladie	Agent pathogènes	Organe touché	symptômes	Source	Image
Flétrissement verticillien.	<i>Verticillium Albo – atrum.</i>	des feuilles.	-flétrissement des jeunes feuilles enroulement, jaunissement. -la présence d'un brunissement interne dans la racine.	(LACROIX, 2002).	 <p>Figure 18: flétrissement verticillien sur les tiges et les feuilles de luzerne.</p>
Le Rhizoctone violet.	<i>Rhizoctonia violacea.</i>	les racines.	- Tâches brunâtres flétrissements d'un groupe de pieds -pourritures des racines.	(FREDON Nord-Pas-de-Calais, 2019).	 <p>Figure 19: flétrissement d'un groupe de pieds de luzerne.</p>
rouille jaune des nervures du trèfle.	<i>Uromyces striatus.</i>	Nervures des feuilles.	-apparition de taches circulaires jaunes ou orange concentriques sur les feuilles.	(ANSES ; 2013).	 <p>Figure 20: Des taches circulaires jaunes ou orange concentriques sur les feuilles du trèfle.</p>

<p>Anthracnose de Maïs.</p>	<p><i>Colletotrichum graminicola.</i></p>	<p>-Tige. - feuilles.</p>	<p>-de lésions beiges. -jaunissement et flétrissement puis dessèchement.</p>	<p>(L'ontario, 2014).</p>	 <p>Figure 21 : anthracnose sur les feuilles de maïs.</p>
<p>Phoma, Ascochyte de la luzerne ; tige noir de la luzerne.</p>	<p><i>Phoma, medicaginis</i> <i>Ascochyta imperfecta</i> (complexe).</p>	<p>-tige. - feuilles.</p>	<p>-lésions blanche allongées/ovales. En stade avancé, couleur allant du brun foncé au noir qui peuvent évoluer en chancre.</p>	<p>(Burkhalter F 2010).</p>	 <p>Figure 22: phoma sur les tiges de la luzerne.</p>
<p>fusariose du pied.</p>	<p><i>Fusarium foot rot.</i></p>	<p>-racine. -collet.</p>	<p>-la pourriture des racines et du collet .</p>	<p>(Elyacoubi et al., 2012).</p>	 <p>Figure 23: pourriture des racines et ou du collet.</p>

<p>Alternariose.</p>	<p><i>Alternaria alternata.</i></p>	<p>-tiges. - feuilles.</p>	<p>-petites taches noires. -concentriques irrégulières.</p>	<p>(Ralph Dean et al, 2012).</p>	 <p>Figure 24: alternari alternata sur les feuilles et les tiges du colza.</p>
<p>La fonte de semis et la pourriture au collet du soja.</p>	<p><i>Sinorhizobium meninoti.</i></p>	<p>-racines. - feuilles.</p>	<p>-Pourriture molle brune -Les feuilles sont jaunes et flétries.</p>	<p>(Hartmann, 2015).</p>	 <p>Figure 25: Pourriture molle du soja.</p>

Suite de tableau 03 : principales maladies fongiques.

2.1.4 Exemples des principales maladies fongiques menacent les cultures fourragères

➤ Alternariose :

•agent causal : *Alternaria alternata* (Aalbu.R ,2021).

•Taxonomie :

Règne : *Fungi*

Division : *Ascomycota*

Classe : *Dothideomycetes*

Sous-classe : *Pleosporomycetidae*

Ordre : *leosporales*

Famille : *Pleosporaceae*

Genre : *Alternaria*

Espèce : *Alternaria alternata* (Fries, 1816)

•symptomatologie :

Les principaux symptômes de l'alternariose sont :

- Sur les feuilles : taches nécrotiques concentriques de couleur claire puis elles brunissent (rosicola ,1965).
- Sur les tiges : des petites taches noires très allongées (Chevalier, 2019).
- Sur fruit : Petites taches noires circulaires aux contours nets (Chevalier, 2019).



Figure 26: *Alternaria alternata* sur feuilles,les tiges et les fruits de colza

➤ **Verticilliose :**

•agent causal: *Verticillium Albo – atrum* (Ephytia, 2022).

•**Taxonomie :**

- Règne : *Fungi*
- Division : *Ascomycota*
- Classe : *Sordariomycetes*
- Sous-classe : *Hypocreomycetidae*
- Ordre : *incertae sedis*
- Famille : *Plectosphaerellaceae*
- Genre : *Verticillium*
- Espèce : *Verticillium Albo – atrum* (W. Gams, Summerb. & Zare ,2007).

•**symptomatologie :**

Les principaux symptômes de la verticilliose sont :

- Un jaunissement internervaire, puis on observe des taches nécrotiques qui augmentent de taille progressivement (Figure 27).

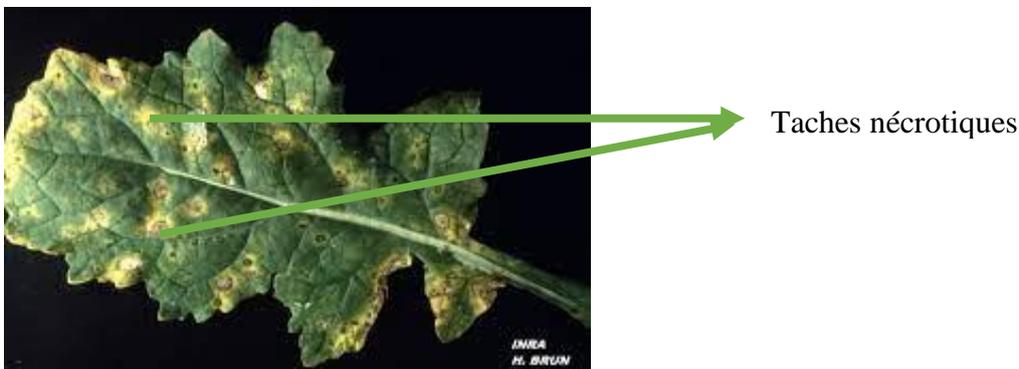


Figure 27 : Symptômes de *Verticillium albo- atrum* sur feuille de colza (Ephytia, 2022).

➤ **Fusariose :**

•Agent causale : *Fusarium oxysporum* (Anaissie, 2014).

•**Taxonomie :**

- Règne : *Fungi*
- Division : *Ascomycota*
- Classe : *Sordariomycetes*

- Sous-classe : *Hypocreomycetidae*
- Ordre : *Hypocreales*
- Famille : *Nectriaceae*
- Genre : *Fusarium*
- Espèce : *Fusarium oxysporum* (Schltld., 1824)

•**Symptomatologie :**

Les principaux symptômes de la fusariose sont :

- Des pourritures des racines et/ou du collet, jaunissement (**Gordon, 1965**) et le flétrissement vasculaire de plante (**Ieston, 2013**).



Figure 28: *Fusarium oxysporum* sur les collets, des feuilles et les plantes (**Miller, 2014**).

2.2 Les moyennes de lutte :

Actuellement, il n'existe aucun moyen réellement efficace pour contrôler totalement les maladies d'origine fongiques (**Bounoua, 2011 ; Ramaiah et al, 2015**). mais les chercheurs sont toujours à pied d'œuvre pour trouver de nouvelles méthodes et améliorer les techniques classiques pour lutter et diminuer la progression des maladies, généralement dans le cadre de la lutte contre les agents phytopathogènes particulièrement contre les agents fongiques ,il existe des luttés curative (éradiquer la maladie quand elle est présente) , préventive (diminuer la maladie et prévenir la contamination pour réduire l'inoculum et contrôler) (**Bekkar, 2016**). Il existe plusieurs types de lutte qui sont des moyens de base qui suffisent dans bien des cas à obtenir des cultures en bonne santé, et par conséquent une bonne qualité de l'aliment consommé par le bétail (**Schaber, 1992**).

2.2.1 La lutte culturale :

En agriculture, la lutte culturale est l'une des méthodes les plus utilisées pour prévenir les maladies, elle fait appel à des techniques et à des méthodes qui visent à défavoriser le développement des pathogènes, en modifiant leur environnement naturel et en perturbant leur cycle biologique. Elles peuvent inclure, par exemple, la pratique de rotations culturales adaptées, la modification du pH du sol, le niveau de fertilisation, les techniques d'irrigation, et l'élimination des résidus de récolte...etc. La lutte culturale est intéressante dans la mesure où elle n'implique pas de coûts supplémentaires donc elle peut s'intégrer dans les objectifs économiques de l'exploitation (**Randy, 2010**). Toutes ces méthodes ne sont pas suffisantes pour protéger totalement contre les infections (**Bulit et al, 1967**). Parmi ces méthodes il y a le travail du sol, le binage mécanique (**Marye, 2004**), la rotation des cultures (**Larry, 1998**), et autres cultures associées (**Robert, 2004**).

2.2.2 La lutte physique :

En protection des cultures, la lutte physique contre les bio agresseurs (agents pathogènes, ravageurs, mauvaises herbes) comprend l'ensemble des méthodes faisant appel à des moyens physiques et mécaniques, qui peuvent être employés tant en phase de culture (période de végétation) qu'après la récolte pour protéger les denrées stockées (**Charles, 2000**). Les méthodes de lutte physique sont pour certaines aussi anciennes que l'agriculture (piégeage, échenillage contre les ravageurs animaux, sarclage contre les agents phytopathogène), tandis que d'autres font appel à des techniques plus récentes, telles les radiations électromagnétiques ou les méthodes pneumatiques (aspiration ou soufflage) (**Bernard, 2000**). **Anchisi et al, (1985)**. Ont développé un traitement à l'eau chaude pour protéger les plants dans un sol où

l'on sait la maladie présente. La méthode consiste à traiter les racines avec de l'eau à 48-49°C pendant 30 secondes avant de les transplanter. Cela stimule la croissance des racines. La solarisation des sols est le choix conforme d'une conduite culturale défavorisant l'installation et la croissance de l'agent pathogène (**Woltz et Jones, 1981**). La fumigation du sol est efficace dans l'élimination de l'inoculum déjà présent dans le sol, mais comme c'est toujours à recommencer, il ne s'agit pas d'une solution à long terme (**Fravel et al, 2003 ; Miguel et al.2004 ; Scott et al. 2012**).

2.2.3 La lutte chimique :

La protection des plantes peut être assurée par une lutte chimique aveugle qui consiste à répandre des pesticides (insecticides, herbicides, fongicides, acaricides.... etc.) souvent à forte dose et sans se soucier du niveau des populations des organismes nuisibles (microorganisme pathogènes) conçue pour éliminer ou limiter (fongistatique) le développement des champignons parasites des végétaux (**Mutat Res, 2012**). Elle est efficace mais présente beaucoup d'effets néfastes. Elle se fait par une désinfection du sol à l'aide de fongicides afin d'éliminer le maximum des agents phytopathogène susceptible d'être en contact avec la plante et ou la semence (**Touze, 1979**). De nombreux fongicides sont disponibles et efficaces pour lutter contre les champignons pathogènes (**Bolton, 1984 ; Song et al, 2004**), mais l'augmentation de leur utilisation provoque plusieurs effets négatifs ayant des conséquences lourdes sur l'environnement (**Tramier et Bettachini, 1974 ; Ramaiah et al. 2015**) comme l'apparition de souches résistantes aux fongicides, la pollution des nappes phréatiques.

2.2.4 La lutte génétique :

L'amélioration de la résistance des plantes cultivées aux pathogènes constitue un objectif majeur de la plus part des programmes de sélection génétique (**Rapilly ,1990**), qui visent la recherche de variétés nouvelles, cultivables ayant une meilleure adaptation et un niveau de résistances élevés aux facteurs dépressifs abiotiques (édaphique, climatiques, chimique ...) et biotiques (**Vilain, 1989**). La recherche et le développement d'espèces ou de cultivars résistants sont devenus une préoccupation majeure, chez les sélectionneurs et les chercheurs travaillant dans le domaine de l'amélioration génétique des plantes. Dans cette lutte on fait la sélection pour la résistance génétique aux maladies particulièrement les maladies fongiques (**Huang et Lindhout, 1997 Hawkins et al, 2001 ; Schneider et al., 2001 ; Diener et Ausubel, 2005 ; Halila et al., 2008**).

2.2.5 Lutte intégrée :

la lutte intégrée ou protection intégrée est définie comme étant la « conception de la protection des cultures dont l'application fait intervenir un ensemble de méthodes satisfaisant les exigences à la fois écologiques, économiques et toxicologiques en réservant la priorité à la mise en œuvre délibérée des éléments naturels de limitation et en respectant les seuils de tolérance (INRA , 2012).C'est la combinaison de toutes les techniques précédentes afin de lutter contre les agents phytopathogènes pour une longue durée. Ces méthodes ne sont efficaces que si l'on a une meilleure connaissance des mécanismes qui sont à l'origine des interactions entre la plante et l'agent pathogène (Corbaz, 1990 : Kavanagh, 2005). Par conséquent, une bonne pratique agronomique doit être combinée avec d'autres méthodes de lutte pour faire face à tous les facteurs de menace possibles afin de contrôler les maladies (Pirgozliev et al. 2003 ; Ye et al., 2017).

2.2.6 Lutte biologique :

Lorsque les pesticides conventionnels ne peuvent pas être utilisés compte tenu de préoccupations éco-toxicologiques liées à l'accumulation potentielle de leurs résidus (Bais et al. 2006). Le bio contrôle de ces bactéries joue le rôle dans la prévention ou la limitation de l'établissement des agents pathogènes majeur ou mineur (Carolee et al., 1991 ; Gilles et al., 2005).La lutte biologique est définie comme une stratégie écologique utilisant des microorganismes vivants ou leurs dérivés pour réduire un agent pathogène ciblé (Legrand et al, 2017). L'une des stratégies pour contrôler la colonisation par les espèces phytopathogènes et leur contamination dans les cultures repose sur l'application d'agents auxiliaire de lutte biologique (ACB) (l'utilisation de microorganismes non pathogènes pour empêcher ou réduire les pertes ou les dommages causés par les organismes nuisibles aux productions végétales (Suty, 2010) et de métabolites microbiennes et végétaux bioactifs (des molécules et des substances qui possèdent des propriétés biologiques non nécessaires pour le fonctionnement quotidien de la plante tels que : les flavonoïdes, les terpénoïdes, les alcaloïdes et les molécules de signalisation cellulaires (Jones, 2000) ont plusieurs fonctions importantes au niveau des plantes sont présenter dans le (tableau n°04), qui peuvent aider à réduire l'utilisation de fongicides (Ferrigo et al, 2016).

Tableau 4: les fonctions des métabolites secondaires.

Métabolites secondaires	Fonction
Les flavonoïdes	Ont un rôle antioxydant, les flavonoïdes dégrade les parois des cellules, les protéines ou l'ADN des organismes pathogènes (Vidal, 2008). les flavonoïdes de type flavones empêchent la conversion du trichodiane (Gauthier et al. 2015).
Les terpénoïdes	Lorsqu'ils sont sécrétés il affecte la croissance en induisant leur apoptose et en empêchant le développement des conidies (Hornby & Nickerson, 2004).
Les alcaloïdes	Ecartent et éloignent les animaux herbivores ou les attaques d'insectes (Jacques, 2011).
Autres métabolites secondaires comme	comme molécules de signalisation cellulaires pour activer la résistance systémique induite (Callaway, 2011).

L'avantage de la lutte biologique c'est qu'elle est moins coûteux et efficace à long terme, Elle vise à diminuer la densité des populations des pathogènes, pas à les faire disparaître. Certains agents de lutte ont de très bonnes capacités car ils peuvent se reproduire et se propager seuls comme les rhizobactéries (PGPR) (**gammvert, 2018**), mais aussi elle a des inconvénients, leur efficacité est pas toujours constante d'une production à l'autre (relative aux conditions climatiques) (**Thierry, 2011**), aussi les risques de la mutation sont élevées et sont capable de provoquer une menace pour l'environnement lors d'un changement des gènes (**gammvert,2018**).

Chapitre II : les Rhizobactéries Bénéfiques

1 Généralités :

Ils sont représentés par un groupe connu sous le nom du PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) ; se sont un ensemble de microorganismes bactériens saprophytes et telluriques (**Kloepper et Schroth, 1998**) qui vivent au niveau de rhizosphère et du rhizoplan car ils ont la capacité de coloniser intensément le système racinaire pour utilisées les exsudats rhizodéposé par la plante. Leur potentiel bénéfique s'exprime en terme de stimulation de la croissance végétale et du biocontrôle vis-à-vis des agents phytopathogène (**Schippers et al, 1987 ; Kloepper, 1992 ; Van Loon et al, 1998 ; Bowen and Rovira, 1999 ; Ryu et al, 2005 ; Ramos Solano et al, 2006 ; Saravanakumar and Samiyappan, 2007**). Effectivement et d'après **Kloepper (1993)**, les PGPR se distinguent par leur capacité à coloniser la surface racinaire, à multiplier, à survivre, et à être compétitif vis-à-vis des autres micro-organismes se retrouvant dans le même écosystème, tout en stimulant la croissance des plantes (**Glick, 2012 ; Souza, 2015**).

L'interaction entre les PGPR et les plantes se fait par une attraction initiale par chimiotactisme (les glucides et les acides aminés sécrétés par la plante attirent les micro-organismes) suivit d'un attachement, puis une prolifération et une colonisation racinaire. Par la suite, les PGPR continuent de se multiplier grâce aux exsudats racinaires et persistent sur les racines. L'association entre les PGPR et la plante résulte d'une communication étroite entre les deux partenaires. (**Bais et al, 2006 ; Huang et al, 2014**). Plusieurs propriétés intrinsèques contribuent au pouvoir colonisateur citant : la faible exigence nutritionnelle, la vitesse de croissance et la mobilité (**Lugtenberg et al., 2001, Van Den Broek et al., 2003**) Pour la plante généralement lors de déclenchement de processus de défense, elles produisent des substances toxiques sur les sites d'infections comme les éliciteurs qui par la suite déclenchent les gènes activateurs à la résistance (**Glazebrook, 2005**).

2 La diversité des PGPR :

Les PGPR sont connu par leur diversité de genres et d'espèces, ces derniers appartiennent majoritairement aux quatre phyla suivants : les Firmicutes, les Actinobacteries, les Proteobacteries, et les Bacteroidetes (**Hugenholtz, 2002**).

2.1 Firmicutes :

Le genre principal de cette classe c'est le *Bacillus*. Ce dernier forment un groupe de bactéries à Gram positif, appartenant à la famille des bacillacées, de forme bacilles, ils sont aérobies ou aéroanaérobies facultatives, et tirent leur énergie par respiration oxydatives ou par fermentation. Ces bactéries sont capables de produire des endospores leur permettant de résister aux conditions environnementales défavorables. Celles-ci donneront naissance à de nouvelles bactéries en cas de conditions favorables. Les *Bacillus* sont hétérotrophes, majoritairement saprophytes et ubiquitaires. Elles sont fréquemment retrouvées dans le sol où certaines espèces peuvent avoir un rôle dans le cycle du carbone et de l'azote (**Walker, 2009**). Les espèces saprophytes sont responsables de multiples dégradations de produits alimentaires (sûrissement et caillage du lait, etc.). L'espèce *Bacillus subtilis* (Figure 29) est également utilisé dans la lutte contre certaines maladies fongiques des plantes pour sa capacité de produire des molécules aux propriétés antibiotiques telles que la tyrothricine, la polymyxines, le bacitracine...etc (**Brian J. Werth, 2020**), et des molécules antifongiques comme la mycosubtiline) (**Cohn, 1872**) et des toxines entomopathogènes. De plus, les *Bacillus* ont la capacité de former des endospores de petites structures cellulaires thermorésistante qui assurent la survie des bactéries en cas de stress environnemental faciles à produire, à stocker et à transporter (**Yareli, 2021**).

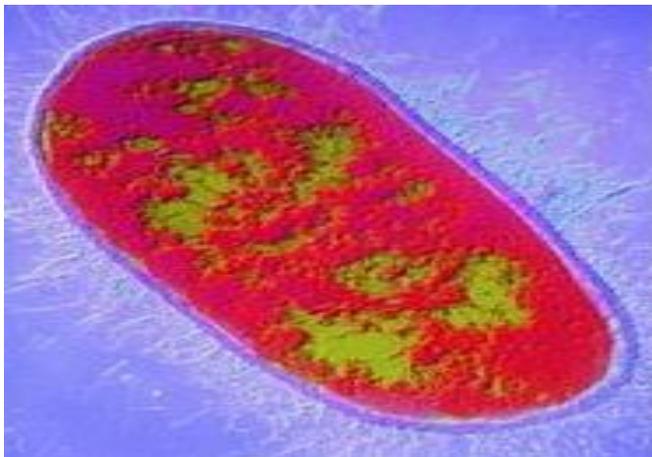


Figure 29 : *Bacillus subtilis* sous le microscope électronique * 50.000(**Wenjing, 2018**).

2.2 Actinobacteria :

Dans ce phylum, aussi il y des genres qui sont capable de fixer l'azote de façon symbiotique, Ces bactéries sont associées à des plantes actinorhiziennes (**Gray et Smith, 2005**). Le genre principale de ce phylum est *Frankia* (**Margulis, 1974**). Cette dernière peuvent se développer en association symbiotique avec les racines de plantes hors légumineuses et adaptés aux stress

édaphiques comme la salinité élevée, les métaux lourds ou les pH extrêmes (**Stewart W.D.P. & Pearson M.C., 1967**). Les actinobactéries sont des procaryotes très recherchés en biotechnologie à cause de leur rôle important dans la production des composés bioactifs. Ce groupe de bactéries a fourni un nombre considérable d'enzymes, de composés anti tumoraux, des agent immunosuppresseurs, des insecticides, des antiparasites, des herbicides, des antioxydant et surtout des antibiotique (**Solanki et al., 2008**). Plusieurs antibiotiques produits par les actinomycètes sont actuellement utilisés dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes. Cette activité antagoniste est également liée à la production de composés antifongiques extracellulaires et des enzymes hydrolytiques (**Prapagdee et al, 2008**). Parmi les espèces d'actinobactéries, les Streptomyces sont les plus importants de point de vue production d'antibiotiques et autres métabolites secondaires ; 75% des antibiotiques connu sont produits par les espèces de streptomycètes (**Ravel et al. 2000**). En plus des Streptomyces, d'autres genres appartenant toujours aux actinobactéries sont également des producteurs de molécules possédant des activités antifongiques (**Sanglier et Trujillo, 1997**). Les ramicidines sont par exemple des antifongiques produits par une souche d'*Actinomadura bibisca* (**Tomita et al, 1990**).

2.3 Bacteroidetes :

Le phylum "Bacteroidetes" comporte trois grandes classes de bactéries, "Bacteroidia", "Flavobacteriia" et Sphingobacteriia" (**Garrity et al. 2005**), qui sont largement répandues dans l'environnement, notamment dans le sol, dans les sédiments, l'eau de mer, etc. (**Bergey's, 2010b**). La caractéristique principale de ce phylum est : au sein des racines nodulaires, ces bactéries sont capables de se différencier en bactéroïdes, et de convertir le N₂ en NH₃ (**Parniske, 2003**).

2.4 Proteobacteria :

Les protéobactéries forment un groupe de procaryotes d'environ 5000 espèces diversifiées. Certain de ces espèces interviennent dans la décomposition des minéraux (ordre des Burkholderiales) (**Lavoisier, 2011**), d'autres dans la fixation biologique de l'azote (rhizobium, frankia, actinomycetes...), la production de phytohormones et aussi dans l'antagonisme par la production des métabolites secondaires anti-microbiennes (**Loper et Schroth, 1981**). Le phylum de proteobacteria comprend trois classes :

a) Les Alphaproteobacteria :

Les PGPR appartenant à cette classe sont les *Rhizobia*, se sont des bactéries aérobies du sol appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*, caractérisé par leur capacité à fixer l'azote et à produire des nodules au niveau du système racinaire des légumineuses (Ueli A. Hartwig, Cecilia M. Joseph, and Donald A. Phillips, 1991).

b) Les Betaproteobacteria :

Quelques souches comme *Bokkolderia* ont la capacité de fixer de façon symbiotique l'azote avec les hors-légumineuses (Bell, 2006).

c) Les Gammaproteobacteria :

C'est la classe de bactéries la plus nombreuse regroupe probablement la forme de vie la plus abondante et la plus répandue sur la planète. Caractérisée par la capacité de fixer l'azote sans produire des nodules, Ce genre comprend en effet plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires comme les *Pseudomonas* qui a été étudiés comme agents potentiels de lutte biologique contre des maladies aussi diverses telles que les fontes de semis, les pourritures de racines et les fusarioses (Sturz et Christie, 2003).

➤ Les Pseudomonas :

Le genre *Pseudomonas* (Migula 1894) appartenant aux protobactéries, à la famille des Pseudomonadaceae, est un des plus complexes genres bactériens. Il possède le plus grand nombre d'espèces (231 espèces publiées) de tous les genres de bactéries Gram négatives (Peix , 2018). Ce genre , hautement hétérogène , a fait l'objet de plusieurs reclassements sur la base d' études phénotypiques, chimio taxonomiques et génétiques (Palleroni , 1993 ; Anzai et al . 2000 Palleroni , 2015 Peix , 2018). Le genre *Pseudomonas* représente un groupe de bactéries important pour l'environnement, dotées d'une grande polyvalence métabolique et possédant un large spectre de systèmes enzymatiques (Vasconcellos et al. 2017). Avec des besoins nutritionnels simples, Ces bactéries se retrouvent quasiment dans tous les peuplements naturels, le milieu marin et l'air et le sol (Andreani et al. 2015). Ces bactéries se retrouvent aussi dans des échantillons cliniques humains, dans des produits d'origine animale et dans des parties vivantes des plantes (Pascual et al. 2015) dont certaines espèces sont bien connues pour leur rôle bénéfique avec les plantes d'autres en bioremédiation (Mulet et al, 2000, Sun et of 2017). Ce genre regroupe des bactéries aérobies, en forme de bâtonnets arrondis renflés, ils sont droits et fins ; d'une taille moyenne de 2 sur 5 µm (Palleroni, 1984). Ces bactéries sont asporulées et certains peuvent produire des pigments (Willcox,

2007). Ces bactéries sont mobiles grâce à une ciliature polaire monotriche, lophotriche ou multitriche. Elles se cultivent sur des milieux usuels non enrichis et sont capable d'utiliser de nombreux substrats hydrocarbonés comme sources de carbone et d'énergie. Elles présentent un type métabolique chimio-organotrophe oxydatif (Meliani, 2012). Les espèces les plus étudiés sont *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas Putida* (Figure 30). Beaucoup de recherches sont concentrées sur ces deux espèce de bactéries parce qu'ils sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies liées au sol. Ils ont la capacité de produire de nombreux antibiotiques, et ils sont faciles à cultiver et à être manipuler en laboratoire (Haas et Defago, 2005). Les *Pseudomonas spp* ont été étudiés depuis des décennies pour leurs effets bénéfiques sur la stimulation de la croissance et la suppression efficace des maladies telluriques des plantes (Bakker et al. 2007). Elles montrent de multiples propriétés : l'utilisation efficace des exsudats racinaires, la multiplication dans la rhizosphère (Weller et al. 2002). Elles présentent un intérêt pour l'agriculture ; ce sont les bactéries telluriques les plus étudiés pour leur excellente habilité à la colonisation racinaire et leur grande capacité de produire une large gamme d'enzymes et de métabolites secondaires (antibiotiques, sidérophores, phytohormones) (Broek and Vanderleyden 1995 ; Kloepper et al. 1991 ; Lugtenberg et al. 1991 ; Weller 1988). De plus, elles exercent un effet sur le développement des plantes soit par stimulation de la croissance ou par inhibition vis-à-vis des champignons et des bactéries telluriques. En faisant intervenir divers métabolites, qui peuvent affecter les pathogènes par des actions d'antibiose et/ou de parasitisme et/ou de complétion trophique.

Taxonomie :

La classification du genre *Pseudomonas* a été trace par Migula (1894) dans le Manuel de Bergey 1923 (Das et al, 2020) est subdivisé en deux sous-groupes : les non fluoerescents et les groupes des fluorescents.

Domaine : *Bacteria*

Phylum : *Proteobacteria*

Classe : *Gammaproteobacteria*

Ordre : *Pseudomonadales*

Famille : *Pseudomonadaceae*

Genre : *Pseudomonas*



Figure 30 : *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas Putida* dans des boites du pétri (trevisan, 1889).

La plupart des rhizobactéries stimulatrices et phytoprotectrices favorisent la croissance des plantes en réduisant le niveau de certaines maladies et le genre *Pseudomonas* particulièrement le groupe des fluorescents sont les plus activé et elles peuvent agir (Arjan et al. 1997) :

- ✓ par antagonisme en produisant des antibiotiques délétères pour les pathogènes.
- ✓ par interférence avec des signaux, en détruisant les molécules signaux des pathogènes.
- ✓ en activant la résistance systémique induite des plantes, qui augmente la résistance des plantes à l'attaque des pathogènes.
- ✓ en contrôlant la croissance des pathogènes par la compétition pour les éléments nutritifs, comme la compétition pour le carbone et la compétition pour le fer dont la biodisponibilité dans le sol est très faible.

3 Effets des PGPR sur le développement des plantes :

Il est reconnu que les PGPRS sont dotées d'une machinerie de biocontrôle (Ciancio et al . , 2016 , Mishra et Arora , 2017 Sun et al 2017 , Jayanthi et Kanimozhi , 2018) , également ,ils ont un rôle bénéfique dans l'amélioration de la croissance des plantes par divers mécanismes et la protection de la plante contre les agents pathogènes (Schardl et al., 2004 ; Stefan et al., 2012).

Tout d'abord, il faut noter que les bactéries de types PGPR peuvent être exophytes ou endophytes (Couillerot,2009). Dans le premier cas, les PGPR se développent au sein de la rhizosphère, à la surface racinaire, voire dans les premières couches superficielles de la racine. Dans les relations endophytes, les bactéries résident dans les espaces apoplastiques de la racine (Vessey, 2003). L'exemple le plus étudié des bactéries endophytes est celui des

Rhizobium. Dans ce cas de symbiose particulier Rhizobium – légumineuse, la plante attire les bactéries via la sécrétion de flavonoïdes. En réponse, les bactéries sécrètent des facteurs Nod, permettant la reconnaissance entre les deux partenaires. Les bactéries seront ensuite intercalées dans la racine au sein de nodules (Spaink, 2000).

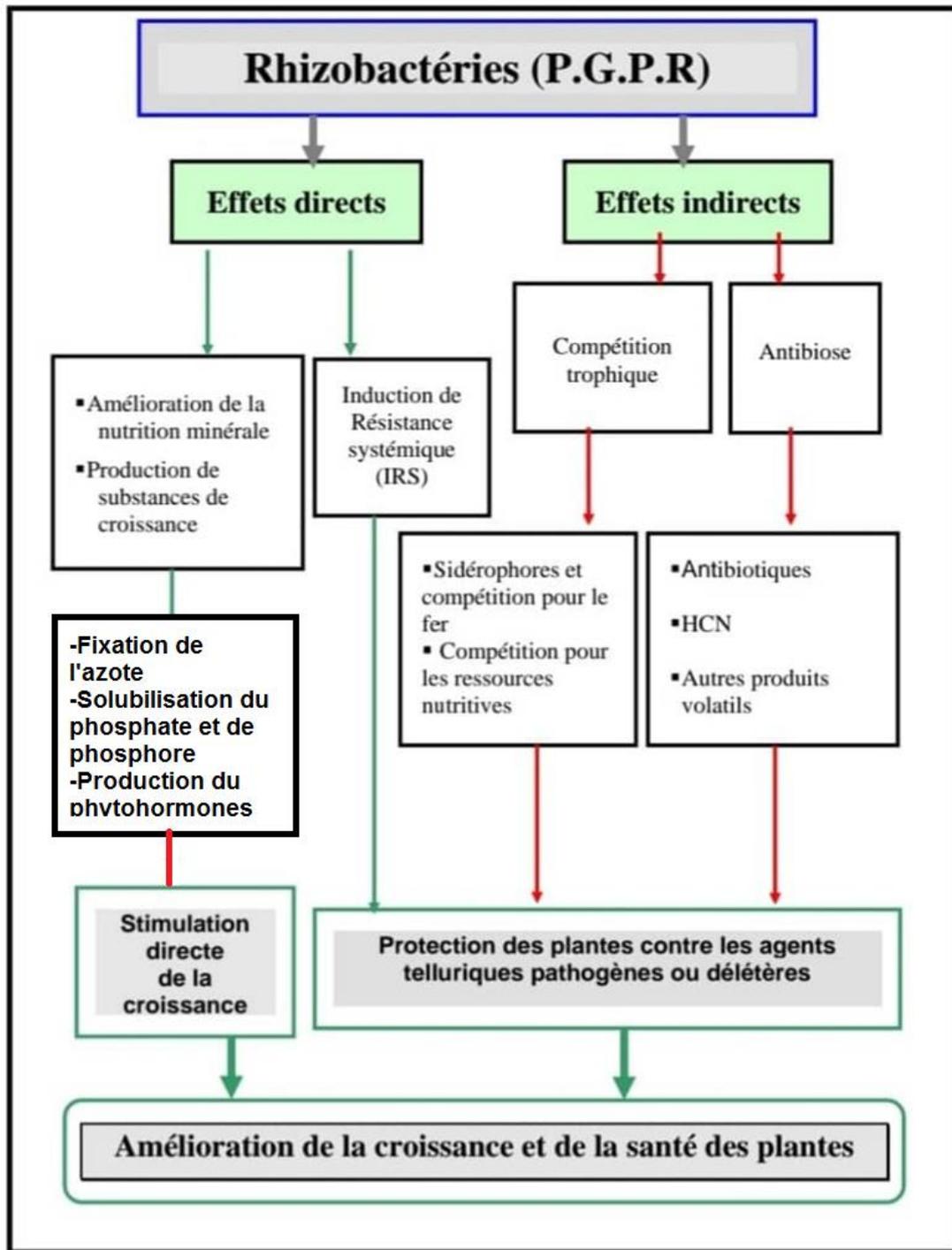


Figure 31 : Effets des PGPR sur le développement des plantes (In Mattar,1993)

3.1 Action directe :

Les bactéries PGPR facilitent la croissance des plantes directement en aidant à l'acquisition des ressources (azote, phosphore et minéraux essentiels) ou par modulation des niveaux d'hormone végétales (**Munees et Mulugeta, 2014**). Ce mécanisme comprend la stimulation bactérienne des phytohormones (AIA ou cytokinine). Cela permet à la plante de développer un système racinaire abondant, lui permettant notamment de coloniser une plus grande surface du sol. Il permet également d'améliorer l'état nutritionnel des plantes (**Beauchamp, 1993 ; Kloepper, 1993 ; Ramos et al., 2009**).

3.1.1 La résistance systémique induite :

Certaines souches de PGPR peuvent protéger les plantes d'une façon indirecte, par la stimulation de mécanismes de défense inductibles dans la plante. Ce qui peut rendre l'hôte beaucoup plus résistant, à l'agression future par des agents pathogènes. Ce phénomène a été nommé «résistance systémique induite» (**Van Loon et al. 1998 ; Pieterse et al., 2002**) qui manifeste par des modifications au niveau de la composition des parois cellulaires ou la libération des éliciteurs qui déclenchent les mécanismes de défense de la plante. Celle-ci produira alors des phytoalexines et des protéines PR, qui lui confèrent une résistance systémique (**Agrios, 1988 ; Toussaint, 1996**).

L'ISR se fait en trois étapes principales (**Ongena et al., 2006**), à savoir :

- ✓ la perception des molécules actives produites par le PGPR ou élicitation.
- ✓ la transmission d'un signal systémique dans la plante.
- ✓ l'expression des mécanismes de défense de l'hôte.

Les plantes inoculées avec des PGPR peuvent également fournir une résistance systémique contre un large éventail de pathogènes végétaux pouvant causer des maladies d'origine fongique, bactérienne et virale. La résistance des plantes est divisée en résistance acquise (RSA) et résistance systémique induite (RSI). La résistance systémique acquise est généralement différenciée par l'apparition des nécroses. Elle se produit en réponse à l'infection d'un pathogène (**Glick, 2012**). Elle entraîne l'expression des gènes de défense (PR) et l'activation de la voie de l'acide salicylique. La résistance systémique induite, par contre, est activée suite à un contact avec les bactéries PGPR (**Walters et al., 2013**). Elle fait

appel à la voie de l'acide jasmonique et de l'éthylène (Henry et al., 2012 ; Parray et al., 2016). Ceci conduit à l'activation d'un grand nombre d'enzymes de défense, telles la chitinase, la β -1, 3- glucanase, la phénylalanine ammonia lyase, la polyphénol oxydase, la peroxydase, la lipoxygénase, SOD, CAT et APX et certaines protéinases. La résistance systémique induite n'est pas spécifique contre un pathogène particulier, mais elle aide la plante à contrôler de nombreuses maladies (Kamal et al., 2014). D'un autre côté, différents composants bactériens peuvent induire RSI, y compris les lipopolysaccharides, les lipopeptides cyclique, les sidérophores, le 2, 4- diacétylphloroglucinol, l'homosérine lactones, et les gaz volatiles, comme 2, 3- le butanediol et l'acétoïne (Goudaa et al., 2018).

Les ISR peuvent soit induire un changement soutenu des plantes qui augmente la capacité de tolérance à l'infection par les agents pathogènes, elle induire les défenses locales et/ou systémiques de l'hôte de la plante entière contre un large spectre d'agents, ce mécanisme est principalement médiée par l'acide jasmonique et/ou l'éthylène (Walia et al., 2021). Des éliciteurs qui déclenchent l'état d'ISR contre de multiples phytopathogènes sont les lipopolysaccharides, les sidérophores (pseudobactines et pyocheline). Les antibiotiques (pyocyanine, 2,4- diacétylphloroglucinol)... (Müller et Behrendt, 2021).

3.1.2 Production des phytohormones :

Sous un stress abiotique tel que la sécheresse, l'engorgement, les températures extrêmes, la salinité et le stress oxydatif, la production d'une variété de phytohormone et des régulateurs de croissances comme ABA, GA, CK et AIA par les *Pseudomonas spp. Fluorescents* peut altérer l'architecture des racines et favorise le développement des plantes (Gatineau, 2005). Il a été rapporté que les phytohormones jouent un rôle important dans l'augmentation de la surface et la prolifération des racines, dans la stimulation de la germination des graines et des tubercules et dans la division cellulaire, ce qui va en conséquence permettent l'augmentent de l'absorption de nutriments et d'eau par la plante (Parray et al. 2016 ; Etesami et Adl, 2020).

➤ Acide Indole Acétique (AIA) :

La synthèse d'AIA par *Pseudomonas* est bénéfique pour la croissance et le développement végétal (Sandhya et al. 2009). Environ 80 % des bactéries rhizosphériques sont capables de produire de l'AIA (Dastager et al, 2010). L'AIA représente l'une des hormones végétales les plus importantes, ce qui renforce de nombreux aspects de la croissance et du développement des plantes tout au long du cycle de la plante, de la division cellulaire, de l'allongement cellulaire et de la différenciation (Guilfoyle et al, 1998). Elle stimule la germination des

semences et des tubercules ; Augmente le taux de développement du xylème et des racines, Contrôle les processus de croissance végétative ; Initie la formation de racines latérales et accidentelles, Médiatise les réponses à la lumière, à la gravité et à la fluorescence, Affecte la photosynthèse, la formation de pigments, la biosynthèse de divers métabolites et la résistance à des conditions stressantes. En outre, l'AIA bactériennes augmentant la surface et la longueur de la racine et fournit ainsi à la plante un meilleur accès aux nutriments du sol (**Cherif, 2014**). La biosynthèse de l'AIA est largement répandue chez les *Pseudomonas spp* fluorescents, d'une manière prédominante à partir du tryptophane par la voie de l'acide indole - 3 - pyruvique (**Oberhansli et al, 1991. Forlani et al. 1995, Persello Carteaux et al, 2003**). Le L - tryptophane est considéré comme le précurseur du fait que son adjonction est nécessaire à la production de cette hormone. Les exsudats racinaires sont une source naturelle de L - tryptophane pour la microflore de la rhizosphère (**Dastager et al, 2010, David et al, 2018**). La production de ce composé est variable selon les souches et les différentes espèces, ainsi que les conditions de culture des plantes, leur phase de croissance et de la disponibilité de substrats nutritifs (**Miraza et al, 2001**).

3.1.3 Solubilisation du phosphate :

Le phosphore est le deuxième nutriment important limitant la croissance des plantes après l'azote, il est largement disponible dans le sol sous deux formes organiques et inorganique (**khan et al, 2009**). Il joue un rôle pratiquement important dans tous les processus métaboliques majeurs dans les plantes, y compris la photosynthèse, le transfert d'énergie, la transduction du signal, la biosynthèse macromoléculaire et la respiration (**Khan et al, 2010**). *Pseudomonas spp. Fluorescents* solubilisent le phosphate inorganique par la production d'acides organiques de faible poids moléculaire comme l'acide citrique et l'acide gluconique. *Pseudomonas spp. fluorescents* minéralise les phosphates organiques insolubles, tels que les phytates, les phosphomono- d'itri esters et les organophosphonates via les actions de diverses enzymes, phosphatase, phytase et phosphonatase (**Parray et al., 2016; Das, 2020; Etesami et Adl, 2020**).

3.1.4 Solubilisation du potassium :

C'est le troisième nutriment majeur important pour les plantes. Les concentrations de potassium soluble dans le sol sont généralement très faibles et plus de 90% de potassium dans le sol existe sous forme de roches insolubles et de minéraux de silicate. Les espèces de *Pseudomonas spp. Fluorescents* tel que *P. chlororaphis* ont été étudiées pour

leur capacité de solubilisation du potassium pour qu'il soit sous une forme disponible pour les plantes (Das, 2020).

3.1.5 Production des enzymes lytiques :

L'amélioration de la croissance par l'activité enzymatique est un autre mécanisme, utilisé par les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes. Ces dernières peuvent produire certaines enzymes, telles que les chitinases, les déshydrogénases, la B - glucanase, les lipases et les protéases etc (Ovadis et al., 2004 ; Kim et al., 2008). qui présentent une activité hyperparasitaire, attaquant les agents pathogènes en excréant les hydrolases sur leurs parois cellulaires (Hayat et al 2010 Joshi et al . 2012) Grâce à l'activité de ces enzymes, les *Pseudomonas fluorescents* jouent un rôle très important dans la promotion de la croissance des plantes, en particulier pour les protéger des stress biotiques et abiotiques par la suppression des champignons pathogènes (Upadyay et al , 2012 Nadeem et al . 2013).

3.2 Action indirecte :

Elle concerne la modification des équilibres microbiens au niveau de la rhizosphère. Les populations pathogènes et délétères sont réduites par déplacement après introduction des rhizobactéries via les semences, le sol ou par bactérisation racinaire (Kloepper et Schroth, 1981 ; Suslow, 1982; Suslow et Schroth, 1982a; Suslow et Schroth, 1982b; Kloepper, 1993). Ce mécanisme repose sur la capacité des PGPR à réduire les effets nocifs pour la plante par la dégradation des xénobiotique dans les sols contaminés, par la production des métabolites qui sont toxique aux pathogènes du sol (Ramos et al., 2009). L'hydrolyse des molécules libérées par des agents pathogènes peut être réalisé en utilisant certaines bactéries auxiliaire, par exemple les *Pseudomonas*, supprime les agents phytopathogènes des plantes entre autres la compétition pour les nutriments et l'espace (Elad Baker, 1985 Elad et Chet, 1987), de sidérophores (Kloepper et al. 1980 ; Lemanceau et al. 1992. Ongena et al. 2005). l'antibiose en produisant des antibiotiques (Pierson et Thomashow , 1992) d'enzymes lytiques (Lim et al . 1991 ; Frindlender et al 1993 , Potgieter et Alexander , 1996 , Velazhahan et al . 1999) , de l'HCN et autres métabolites (Defago et al . 1990).

3.2.1 Inhibition des bioagresseurs par compétition :

La compétition est une interaction entre deux ou plusieurs microorganismes. Elle concerne soit les éléments nutritifs, l'espace ou les autres facteurs environnementaux, qui deviennent limitatifs pour la croissance. (Dommergues et Mangenot, 1970).

➤ Production des sidérophores :

Le fer est un nutriment vital pour presque toutes les formes de vie (Neilands, 1995). Cet oligoélément qui a soumis à une forte compétition certaines bactéries est capable de séquestrer le fer grâce à une molécule appelée sidérophore. Ces sidérophores se lient avec l'ion ferrique et forment un complexe sidérophore-ferrique qui se lie ensuite avec des récepteurs dépendants de la suspension de fer à la surface de la cellule bactérienne. L'ion ferrique est ensuite relâché et actif dans le cytoplasme comme ion ferreux.

Aux alentours des racines, les micro-organismes sont en concurrence pour l'accès aux éléments nutritifs tels que le carbone ou le fer, et donc pour l'espace. Les sidérophores libérés par les PGPR permettent de piéger le Fe dans des complexes que les agents pathogènes du sol ne sont pas capables d'utiliser. Il semble également que les sidérophores produits par les PGPR ont une affinité pour le Fe³⁺ plus élevée que les chélateurs libérés par les autres organismes, ce qui leur confère un avantage compétitif (Glick, 2012 ; Kloeppe et al., 1980). Le rôle des sidérophores est ainsi double ; d'une part ils servent à la nutrition des bactéries PGPR et de la plante, d'autre part ils réduisent les réserves pour les microorganismes pathogènes. La compétitivité des PGPR (sa capacité à persister et à proliférer) (Glick, 1995) est largement plus supérieure quand elles ont des capacités spécifiques d'assimiler certains nutriments ou bloquer leur assimilation par les autres microorganismes (Kempf et Wolf, 1989). Dans certains cas, une réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les microorganismes pathogènes et, par conséquent, leur croissance (Piono et al., 1997).

Les PGPR doivent être présents sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique et être capables d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago, 2005). C'est la colonisation rhizosphérique.

Les bactéries capables de synthétiser des sidérophores sont : *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* (Ahmed et al. 2008). Les bactéries ayant un grand pouvoir de chélation du fer peuvent reconnaître et utiliser les sidérophores qu'elles produisent. Cette particularité peut favoriser la souche dans le processus de la colonisation et la compétition pour un substrat mieux que d'autres microorganismes de la rhizosphère (Ongena et al., 2002).

Les *Pseudomonas spp. Fluorescents* inhibent les agents phytopathogènes en imposant une compétition pour les nutriments et l'espace dans la rhizosphère. La réduction de la concentration d'éléments essentiels comme le carbone, l'azote, le phosphore et d'autres micro-

éléments conduit souvent à diminuer la germination des spores et à une croissance plus lente du tube germinatif (Walia et al., 2021)

3.2.2 L'Antibiose :

Il s'agit du mécanisme par lequel une souche antagoniste inhibe le développement d'une souche cible grâce à la production de métabolites secondaire toxique. Les substances toxiques sont susceptibles de diffuser dans le milieu. Qui signifie que l'effet d'un microorganisme agissant par antibiose ne nécessite pas la juxtaposition des deux microorganismes (Alabouvette et Cordier, 2012). En écologie, le terme d'antagonisme désigne une inhibition, ou une action défavorable d'un organisme vis-à-vis d'un autre, à l'intérieur d'une population microbienne mixte (Curl et Truelove, 1986). L'antagonisme se manifeste généralement soit par une compétition, un hyperparasitisme, un mycoparasitisme, une production de sidérophores ou par une antibiose.

Le mycoparasitisme est une relation trophique qu'établit un microorganisme au détriment d'un champignon. La chitine et le β -1,3-glucanase (laminarine) sont les principaux constituants de la paroi de la plupart des champignons (Bartnicki-Garcia, 1968). Ainsi les agents antagonistes produisant les enzymes lytiques comme la glucanase et la chitinase, qui dégradent les parois du pathogène, ont comme mécanisme d'action le parasitisme.

Un autre mode d'action d'antagonisme directe des agents de protection biologique, le phénomène d'hyperparasitisme (est l'attaque directe d'un microorganisme par un autre dans un but nutritionnel) (De Boer et al., 1998 ; Fernandes, 2006).

L'antibiose est un phénomène d'inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites ayant des propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. La production et la libération des molécules qui tuent ou réduisent la croissance des pathogènes cibles est le mécanisme le plus efficace par lequel les microorganismes peuvent contrôler les maladies des plantes (Harman et Shores, 2007). Il consiste à produire des antibiotiques efficaces contre l'agent pathogène par l'agent antagoniste. Ces molécules bioactives sont des métabolites secondaires à faible poids moléculaire tels que les antibiotiques comme l'amphicine, le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), cyanure d'hydrogène (HCN) et la phénazine qui agissent comme des facteurs contre l'attaque des pathogènes (Corbaz, 1990 ; Babalola, 2010). La production des antibiotiques est un critère très important de compétitivité des microorganismes aux autres populations microbiennes (Compant et al., 2005). Une gamme très large antibiotiques produite par les PGPR a été découverte, entre autres celles

produites par le genre *Pseudomonas* telles que l'amphisine, le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), le cyanure d'hydrogène, l'omycine A, le phénazine, le pyoluteorine, le pyrrolnitrine, la tensine, la tropolone, et les lipopeptides cycliques (De Souza et al., 2003).

➤ **Production des antibiotiques**

La production des antibiotiques par les microbes est le mécanisme clé de la protection contre les maladies phytopathogènes en particulier celles transmises par le sol et les semences (Glick et al., 2007 ; Mazurier et al., 2009).

Les bactéries solubilisant le phosphate telles que les bactéries à Gram négatif, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa* et *Chromobacterium violaceum* sécrètent également des antibiotiques (Taurian et al., 2010) et assurent la protection des plantes contre les pathogènes transmis par le sol (Vassilev et al., 2006).

➤ **Production au cyanure d'hydrogène HCN :**

Le cyanure d'hydrogène (HCN) est un métabolite secondaire qui fait partie des cyanides. Il peut être produit directement de la glycine ou des glycosides cyanogènes (Bakker et Schippers, 1987). Le HCN produit par les PGPR assure un rôle bénéfique pour la plante par son effet antagoniste contre les maladies des racines (Defago et Haas, 1990).

➤ **Autres Composés volatiles :**

Les rhizobactéries peuvent produire des substances organiques volatiles qui inhibent la croissance des agents phytopathogènes telluriques tels que les champignons, parmi ces composés organiques volatiles figurent des terpénoides, des phénylpropanoïdes et des dérivés des acides gras (Piechulla et Pou, 2003). Ces derniers sont produits par les souches de biocontrôle favoriser la croissance végétale en inhibant les agents pathogènes y compris les bactéries, les champignons et les nématodes (Nicole Benhamou et Patrice Rey, 2012).

➤ **Les phénazines :**

Les phénazines chez *Pseudomonas* joueraient un rôle important dans la lutte biologique contre les maladies infectieuses des plantes (Thomashow et Weller, 1988 Thomashow et al, 1990). Ces derniers jouent aussi un rôle dans la compétition rhizosphérique (Mazzola et al. 1992) et aussi dans le métabolisme et le transfert d'énergie (Chen et al, 2012). Encore, plus de 180 produits antibiotiques à base de PHZ sont connus avec des activités antifongiques, insecticides, antitumorales, anticancéreuses (Guttenberger et al., 2017). La PHZ joue

également un rôle important dans l'acquisition du fer, la signalisation cellulaire, la régulation de l'expression génique, la formation de biofilms et la survie des bactéries. Toutes ces fonctions aident les bactéries dans leur compétition et leur colonisation de la rhizosphère procurant ainsi un avantage à leurs producteurs et éloignent les phytopathogène (**Pierson et Pierson, 2010**).

4 Formulation :

La formulation des produits à base d'organismes bénéfiques est un domaine important de la recherche microbiologique et biotechnologique qui concerne la mise au point de formulations qui permettrait de préserver l'activité microbienne pour une longue période (**Ramamoorthy et al., 2001**). Bien que les souches de *Pseudomonas fluorescens* ont grandement contribué à la compréhension des mécanismes qui sont impliqués dans la suppression de la maladie, ces dernières présentent un inconvénient du point de vue application (elles perdent généralement leur viabilité lorsqu'elles sont conservées pendant une période de plusieurs semaines) (**Haas & Defago, 2005**). Par contre, les bacilles en raison de leurs capacité à former des endospores résistantes au changement des conditions du milieu offrent un avantage par rapport aux autres bactéries pour la formulation du produit (**Raaijmakers et al., 2002 ; Cavaglieri et al., 2005**). Malgré cela, il existe peu d'exemples d'application réussie d'inoculant microbiens. Essentiellement, un manque de rendement constant dans différentes conditions environnementales sur le terrain a empêché leur utilisation plus large (**Richardson et al., 2009**).

Diverses formulations existent pour les bio-pesticides à base de bactéries PGPR, notons que les plus intéressantes sont : la suspension bactérienne et les formulations en poudre (**Ramamoorthy et al., 2001**). L'application commerciale de PGPR en vue d'accroître la santé des cultures ou à gérer les maladies des plantes dépend du développement commercial des formulations avec des supports appropriés qui favorisent la survie des bactéries pour une période de temps considérable. Les porteurs peuvent être soit organiques ou non organique. Les supports organiques utilisés pour le développement de formulation comprennent la tourbe, le gazon, du talc, le lignite, la kaolinite, la pyrophyllite, la montmorillonite, l'alginate et la vermiculite, etc.... (**Nakkeeran et al., 2005**). Ces porteurs augmentent le taux de survie des bactéries en les protégeant de la dessiccation et la mort des cellules. Notons que l'utilisation de composte sec comme formulation a augmenté la survie de plusieurs PGPR jusqu'à 12 mois (**Haggag & Saber, 2000**).

Actuellement, diverses formulations commerciales de PGPR sont en vente. Des formulations bactériologiques de *Rhizobium spp.* Sont disponibles dans plusieurs pays afin de favoriser la nodulation des légumineuses et de diminuer la fertilisation azotée des cultures. La formulation " Zea-nit " Plus est en vente en Italie. Il s'agit d'un inoculum à base d'*Azospirillum sp.* Développé pour inoculer le maïs (*Zea mays L.*) (**J. W. KIoeppe**r, **communication personnelle**).

Le problème le plus important qui rend le succès de l'implantation des PGPR incertain en agriculture provient de leur inconstance à promouvoir la croissance des plantes. Cette variabilité peut s'expliquer par les facteurs biotiques et abiotiques affectant la survie et les effets des PGPR en interaction avec d'autres habitants dans la rhizosphère. Il est donc important de comprendre les premières étapes de l'établissement de l'association PGPR-plante afin d'optimiser les succès de la colonisation racinaire et l'expression du principe actif.

Matériels et Méthode

Présentation du travail :

La culture du Maïs est destinée principalement à l'alimentation du bétail en verdure et en ensilage. L'intensification de cette culture a été développée suite à l'utilisation de semences hybrides et à la création de nouveaux paramètres irrigués. Cependant, le développement de maladies causées surtout par des champignons peut altérer la qualité sanitaire des plantes en provoquant des effets sur la qualité et le rendement et en sécrètent des mycotoxines. Ces dernières sont très toxiques pour l'homme et le bétail et sont responsable d'un taux de mortalité assez important chez ces derniers. Parmi ces mycotoxines, figurent les trichothécènes produites principalement par *Fusarium culmorum* et *F. pseudograminearum* agents causales de la fusariose de l'épi. Etant donné que la lutte contre cette maladie est difficile et se base essentiellement sur l'emploi des fongicides et des pratiques culturales, la recherche d'autres alternatives de lutte basée sur l'antagonisme microbien peut être explorée. (Lori et al, 2009).

Notre travail consiste à faire une analyse de deux articles intitulés :

- ❖ Premier article : "**Bio-suppression de la fusariose du Maïs et réduction des mycotoxines DON par des bactéries antagonistes du genre *Bacillus***" (Gargouri ; Kammoun ; Essair ; Hajlaoul ; Sadfi ; 2016).
- ❖ Deuxième article : "**Bio contrôle in vitro de *colletotrichum graminicola*, agent de l'antracnose foliaire du Maïs "** (Cássia ; Ruth ; Carina ; Lêda ; Francisco ; Eudes de Arruda Carvalho 2016).

Les principales maladies fongiques qui attaquent le Maïs et qui sont étudiés dans ces articles sont : **la fusariose du Maïs** causée par différents espèce de genre *Fusarium* comme *Fusarium culmorum* et *F. pseudograminearum* et qui est considérée parmi les maladies les plus graves et les plus fréquentes, provoquant des pertes appréciables qualitatives et quantitatives à l'échelle mondial sur la culture des fourrages (Alabouvette, 1999). Ces espèces provoquent plusieurs symptômes, elles affectent les jeunes plantes où elles occasionnent un ralentissement de croissance, un jaunissement des feuilles, et les tissus vasculaires seront fortement brunis et finalement la mortalité des plants (Messiaen et al, 1991) Également vu que la plante est destinée comme un des aliments les plus importants pour le bétail. Ce dernier peut être menacé vu la sécrétion des mycotoxines dans certaines conditions par ces champignons (Blancard et al, 2009). Et l'**antracnose foliaire du Maïs**, causée par "

colletotrichum graminicola, " qui est responsable de fortes pertes de productivité. Il s'attaque à la fois aux feuilles et aux tiges et se manifeste par des taches foliaires et par la pourriture de la tige. Les taches foliaires, ovales ou fuselées, mesurent jusqu'à 15 mm de long, avec un centre couleur brun clair et un contour brun rougeâtre (l'Ontario, 2014).

1 Matériels :

1.1 Matériels non biologiques :

Le matériel non biologique utilisée dans ces travaux sont : la verrerie, l'appareillage (Annexe 2), les milieux de culture (Annexe 1).

1.2 Matériels biologiques :

Dans l'ensemble des travaux (l'article 01 et l'article 02) les microorganismes utilisés sont présents dans le tableau 05 :

Tableau 5 : Matériels biologiques

	Les articles	Agent antagoniste	La source	Les références
Matériel microbienne	Article 1	<i>Bacillus subtilis J9, Bacillus pumilus M3-16, Bacillus subtilis K1 11, Bacillus subtilis M1-20, Bacillus subtilis SR146, Bacillus licheniformis J24 Virgibacillus marismortui K1-19</i>	Ces souches de référence Font partie de la collection des microorganismes du laboratoire de microbiologie et biomolécules actives de la Faculté des Sciences de Tunis (Tunisie).	(Kammoun et al, 2009).
	Article 2	les rhizobactéries des genres : Bacillus : - <i>Bacillus 23</i> - <i>Bacillus 14</i> Pseudomonas : - <i>Pseudomonas 41</i> - <i>Pseudomonas 23</i> - <i>Pseudomonas22</i>	Ces souches de référence isolée à partir de produits alimentaires "Socôco" et font partie de la collection du Laboratoire de Phytopathologie Embrapa Amazônia Orienta (Brésil).	(Francisco, 2016)
Matériel végétale	Article 1	Les épis de Maïs	Tunisie	(Kammoun et al, 2009).
	Article 2	Les épis de Maïs	Brésil	(Francisco, 2016)

2 Méthodes :

2.1 Isolement des microorganismes pathogènes :

➤ Article 01 :

Dans cet article, les deux champignons ont été isolés et identifiés au cours d'une étude prospective des espèces de *Fusarium* attaquant le blé dur en Tunisie.

• Collecte d'échantillons :

Au cours de la saison de croissance de blé dur en 2004, 98 champs ont été prospectés au moment de la récolte dans quatre climats de la région du nord de la Tunisie (**Bortoli et al, 1969**) (Figure 32 et tableau 6). Ces régions climatiques représentent plus de 90% de la surface de production de blé en Tunisie. Les champs ont été choisis arbitrairement en fonction d'une distance de séparation approximative de 10 km. Dix épis de blé présentant des symptômes caractéristiques de la fusariose (**McMullen et al, 1997 ; Manning et al, 2000**). Étaient prélevés au hasard dans les champs de blé touchés. Le ces épis, les grains étaient ridés, ratatinés et parfois recouverts d'un blanc ou de couleur rose qui est un des symptômes caractéristique de la fusariose, comme décrit par **Sutton (1982)**.

Tableau 6 : les champs prospectés dans les quatre climats de la région du nord de la Tunisie d'où ont été prélevés les échantillons à analyser.

Type de climat	Nombre des champs prospectés
Climat subhumide	37 champs
Climat semi-aride supérieur	21 champs
Climat semi-aride moyen	20 champs
Climat inférieur semi-aride	20 champs

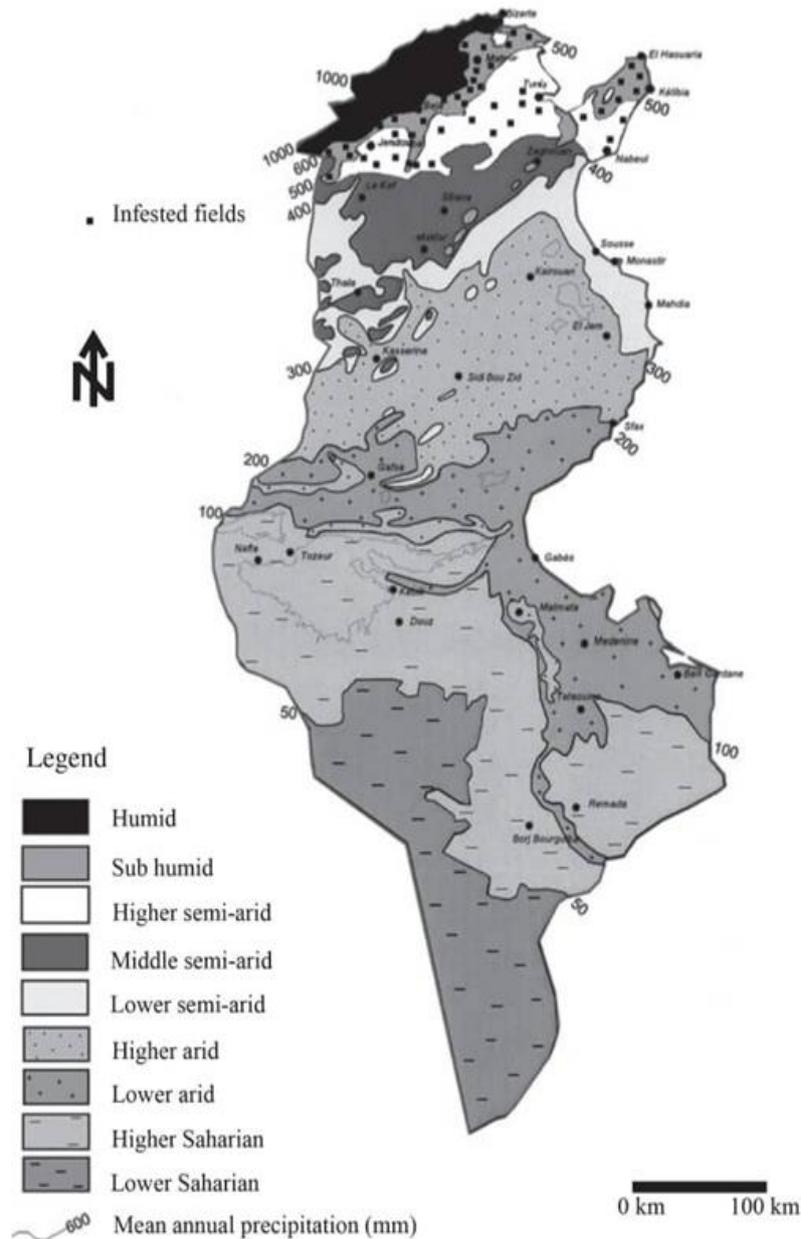


Figure 32 : Carte de la Tunisie montrant la répartition des champs infestés sur différentes régions climatiques (Bortoli et al.,1969)

- **Isolement fongique et identification morphologique des champignons :**

Pour l'identification, 100 grains choisis au hasard parmi les 500 g ont été stérilisés en surface pendant 3 min dans de l'hypochlorite de sodium à 1 %, puis lavés deux fois dans l'eau distillée stérile puis séchés sur papier filtre stérile. Chaque cinq grains ont été placés sur le milieu dextrose de pomme de terre gélosé (PDA) contenant 100 µg/ml de sulfate de streptomycine et incubée à 25°C pendant au moins 7 jours. Les colonies développées ont subi une description macromorphologique et micromorphologique et ont été cultivées sur milieu PDA et incubées à

25°C pendant 5 à 7 jours. Parmi ces colonies 150 isolats ont été purifiés par la culture monospore.

Pour préparer des cultures de spores uniques, les sporodochia extraits des colonies ont été placés dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml contenant 500 µl d'eau distillée stérile. 100 µl de cette suspension ont été étalés sur des boîtes contenant le milieu PDA et incubés à 20°C pendant une nuit. Des conidies germées simples ont été localisées par microscopie et transférées sur des boîtes contenant le milieu PDA séparées. Les cultures monoconidiales ont ensuite été sous-cultivées sur Carnation Leaf Agar (CLA). Les plaques ont été placées sous 12 h d'obscurité alternée/ 12 h de lumière noire combinée à 25 ° C pendant 15 jours. La forme et la taille des macroconidies, le cloisonnement, la présence ou l'absence de microconidies, de chlamydospores et les périthèces ont été enregistrés sur CLA. Morphologie des colonies, densité et pigmentation du mycélium aérien et des médias et l'étendue de la croissance des mycéliums étaient enregistrés. Les isolats ont été identifiés à l'échelle de l'espèce basé sur les clés d'identification décrites par **Booth (1971)** et **Burgess et al. (1994)**. Pour préserver les cultures (mycéliums et conidies) de souches représentatives de chaque espèce cultivées sur CLA, ont été transférés aseptiquement dans 1 ml de glycérol-eau distillé stérile 18% et congelés à -80 ° C.

- **Identification moléculaire :**

Les isolats monoconidiaux sélectionnés ont été soumis à test PCR spécifique à l'espèce utilisant des amorces spécifiques à l'espèce publiées pour *F. culmorum*, *F. pseudograminearum*, *F. avenaceum*, *F. graminearum*. Les étapes de l'identification moléculaire sont les suivantes :

- **Extraction d'ADN :**

Les souches fongiques ont été cultivées pendant 5 à 7 jours dans 100 ml de Potato Dextrose Broth milieu (PDB) à 20°C en utilisant des fioles Erlenmeyer de 250 ml sur un agitateur rotatif à 120*tour.

Après filtration sur mousseline stérile, le mycélium a été lyophilisé (réduit en poudre fine). L'extraction de l'ADN fongique a été effectuée selon le protocole de **Moller et al.(1992)**. Environ 150 µl du mycélium ont été suspendus dans 500 µl du Tampon TES (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 2% SDS) et incubés avec 4µl de protéinase K pendant 30 mn à 55 °C. Après avoir ajouté 140 µl de NaCl (5M) et 65µl CTAB (10%), les tubes ont été

incubés pendant 10 min à 65 °C. 700 µl de chloroforme/alcool isoamylique ont été ajoutés et centrifugés (12 000 tour , 5 min). La phase aqueuse a été transférée dans un tube de 1,5 ml contenant 3 µl de RNAase (10 mg/ml) puis incubé à 37°C pendant 30 min. Un volume de 150 µl d'acétate d'ammonium ont été ajoutés et mélangé doucement. Le mélange a été maintenu sur la glace pendant 30 min puis centrifugé (12 000 tour , 1 min). L'eau phase (environ µl500) a été transférée à un nouveau tube contenant un volume égal d'isopropanol et centrifugé (12 000 tour , 5 min). Pastilles d'ADN obtenues ont été lavés deux fois avec 500 µl d'éthanol glacé (70 %) et séché à l'air. Les culots ont été remis en suspension dans 25 µl de tampon (10 mm Tris-HCl, pH 8,0, 1 mm EDTA) et stocké à 20 °C. L'ADN total a été quantifié par spectrophotométrie.

➤ **Procédure PCR :**

Les PCR ont été réalisées en utilisant 25 µl de mélange réactionnel, contenant 25 ng d'ADN fongique, 200 µM de chacun des dNTP, 1 µM de chacune des amorces de primer et 1,5 unité Taq polymérase dans un Tampon de réaction PCR (10 mm Tris-Hcl, pH 7,5 ; 50 mmKCl; 1,5 mm MgCl₂).

Les amorces utilisées pour chaque espèce est répertoriée dans le tableau 6 :

Tableau 7 : Espèces - amorces spécifiques utilisées pour identifier les espèces de *Fusarium*.

Espèce	Primer	Amplification (pb)	Référence
<i>F.culmorum</i>	FcOIF FcOIR	570	(Nicholson et al.,1998).
<i>F.pseudograminearum</i>	FP1-1 FP1-2	523	(Aoki and O'Donnell.,1999)
<i>F.avenaceum</i>	AvF AvR	920	(Lees.,1995).
<i>F.graminearum</i>	Fg 16NF Fg 16NR	280	(Nicholson et al.,1998).

L'amplification de l'ADN a été réalisée dans un thermocycleur " Biometra, T-1, Gottingen, Allemagne" en utilisant les programmes décrits par **Nicholson et al. (1998)**, **Aoki et O'Donnell (1999)**, **Lees (1995)**, **Nicholson et al. (1996)** et **Nicholson et Parry (1996)** pour *F. culmorum*, *F. pseudograminearum*, *F. avenaceum*, *F. graminearum*, respectivement. Les produits ont été séparés par électrophorèse sur 1% de gels d'agarose avec bromure d'éthidium sur 40 mm de Tris-acétate et 1,0 mm du tampon EDTA et photographié sous lumière UV lumineux.

- **Quantification des mycotoxines dans les échantillons :**

La quantification du DON dans les grains infectés a été effectuée à l'aide d'un kit ELISA (enzyme-linked immunoassay). Pour cette analyse, 200 g de grains ont été collectés au hasard après récolte dans chaque champ infesté. Les grains étaient ensuite broyés en une poudre fine et soigneusement mélangés. 5 grammes de grains moulus ont été secoués dans 25 ml d'eau distillée pendant 3 min et filtrés. 50 microlitres du filtrat ont été utilisés pour le Test ELISA. Les échantillons et les étalons ont été traités en utilisant le kit RIDASCREEN DON (**R-Biopharm AG, Darmstadt, Allemagne**) selon les fabricants des instructions. Ce kit permet de déterminer la concentration combinée de DON. L'absorbance a été mesurée à 450 nm. Un logiciel d'ascension multiskan (**Labsystems, Helsinki, Finlande**) a été utilisé pour le traitement des données.

➤ **Article 02 :**

Les échantillons étudiés ont été obtenus à partir de feuilles de Maïs cultivées dans un système de plantation collectés sur l'ensemble du territoire de Brésil.

Les isolations sont effectuées à partir des échantillons montrant des symptômes typiques d'antracnose, de pourriture ou de dessèchement. Les parties de végétal infectées sont amenées au laboratoire et déposées pendant 24 à 48 heures sous humidité élevée, proche de la saturation afin de favoriser la sporulation du champignon. Lorsque les fructifications sont bien développées, les conidies sont prélevées à l'aide d'une aiguille stérile, transférées sur le milieu de culture Malt, en boîte de Pétri et étalées avec un étaloire. Chaque isolat est alors cloné à partir de spores isolées. Parmi tous les clones qui présentent dans leur majorité un même faciès considéré comme caractéristique de l'isolat, un seul est retenu pour constituer la souche à identifier (**Von arx, 1957**).

Toutes les cultures sont effectuées sur le milieu à l'extrait de Malt. Celui-ci peut être utilisé sous sa forme liquide pour les cultures réalisées en vue de l'analyse électrophorétique ou des

inoculations, et sous forme solide par addition de vingt grammes d'Agar Agar pour la conservation des isolats et l'étude des caractéristiques morphologiques et culturelles. La conservation des souches est assurée par culture en tubes à essai stockés à 20°C et à l'obscurité. Par ailleurs, différentes conditions de culture sont adoptées en fonction des caractères étudiés.

Les caractères étudiés sont observés sur des thalles âgés de huit à quinze jours, cultivés en boîtes de Pétri de 12 cm de diamètre. Toutes les cultures sont soumises à des conditions d'environnement identiques, à savoir : température de 27°C ± 2, obscurité, 80-90 et l'humidité relative (Von arx, 1957).

2.2 Test d'antagonisme *in vitro* :

➤ Article 01 :

Le test d'antagonisme *in vitro* a été réalisé en adoptant la méthode de l'antagonisme direct (Co-culture sur milieu solide).

L'évaluation du phénomène d'antagonisme est réalisé vis - à - vis du *Fusarium culmorum* et *Fusarium pseudograminearum*. Les champignons comme les espèces bactériennes proviennent de pré-cultures en boîtes de 8 mm de diamètre est prélevé puis déposé à l'aide d'un emporte-pièce stérile sur une boîte de Pétri contenant soit le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) ou le milieu TSA (Tryptic Soja Agar) .A une distance de 3 cm de la pastille du *Fusarium*, une souche bactérienne (*Bacillus subtilus*) estensemencée en trait. Chaque souche bactérienne est confrontée au *F.culmorum* et au *F.pseudograminearum*(Figure 33).

Le témoin consiste en une boîte contenant une pastille du champignon de 8 mm de diamètre et où l'inoculum bactérien est remplacé par l'eau distillée stérile (Dennis et Webster, 1971 ; Wong et Baker, 1984 ; Weller et Cook, 1986 ; Inam - ul - Haq et, 2003). L'incubation des boîtes est faite à 28 ° C pendant 5 jours. La lecture des résultats consiste à mesurer la distance parcourue par le champignon en direction de l'antagoniste bactérien.

Ainsi le pourcentage d'inhibition (%) de développement du champignon a été calculé en se basant sur la formule de Whipps (1987) :

$$(\%) \textit{ inhibition} = [(R_{\textit{témoin}} - R_{\textit{test}}) / R_{\textit{témoin}}] \times 100$$

R *témoin* : distance radiale max de la croissance du champignon.

R *test* : distance radiale sur une ligne en direction de l'antagoniste.

A partir de 20 % on peut parler d'inhibition.

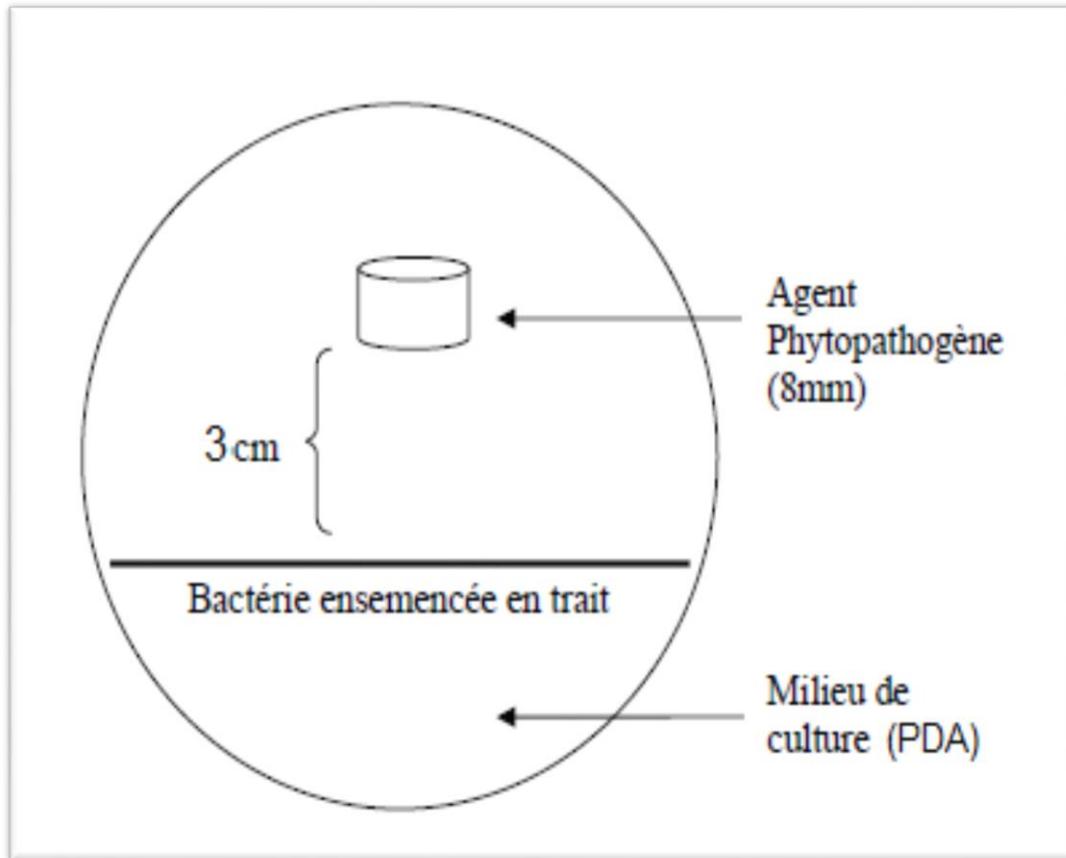


Figure 33 : Méthode de confrontation directe en boîte de pétri entre les souches bactériennes et l'agent phytopathogènes

Les confrontations réalisées :

- ❖ sur milieu PDA : confrontation entre *F. culmorum* et *Bacillus subtilis* M1-20
- ❖ sur milieu PDA : confrontation entre *F. pseudograminearum* et *Bacillus subtilis* M1-20.
- ❖ sur milieu TSA : confrontation *F. culmorum* et *Bacillus subtilis* SR-146.
- ❖ sur milieu TSA : confrontation entre *F. pseudograminearum* et *Bacillus subtilis* SR-146

On plus, ils ont fait des autres confrontations entre deux bactéries et un champignon pathogène :

- ❖ la souche J9 la souche SR-146 contre *F. culmorum*
- ❖ la souche J9 la souche SR-146 contre *F. pseudograminearum*

- **Article 01** : D'autre test en était effectué par les auteurs de l'article 1 qui sont
 - la détection des composées volatiles.
 - la germination des spores.
 - l'essai d'antagonisme *in vivo*.
 - Dosage des mycotoxines dans des grains infestés.

2.3 Effet de l'antagoniste sur le nombre et la germination des spores :

Tout d'abord, pour tester l'effet de l'antagonisme bactérien sur le nombre des spores des deux espèces, un milieu PDB (Potato Dextrose Broth) a été inoculé par les deux espèces de *Fusarium* séparément. Après incubation pendant 5 jours à 25°C, 200µl du milieu inoculé ont été utilisés pour une deuxième inoculation d'un milieu PDA qui a été à son tour incubé durant 10 jours à 25°C. Par la suite les cultures fongiques ont été raclées et filtrées pour obtenir une suspension sporale dont la concentration a été ajustée à 10⁶ spores/ml Sachant qu'au cours de ce test les colonies des bactéries antagonistes ont été cultivées sur le milieu TSB à 5% NaCl pendant 48h à 30°C. Ce test a été réalisé dans des tubes eppendorfs stériles, 200 µl de la culture bactérienne ont été mélangés avec 200 µl de la suspension sporale additionné d'1 µl d'eau stérile à 5% glucose et incubés pendant 24h à 21°C. Le tube témoin n'a pas étéensemencé. Le même mélange décrit précédemment a servi pour déterminer l'effet des bactéries antagonistes sur la germination des spores des deux espèces *F. culmorum* et *F.pseudograminearum*. Les résultats sont détectés par description de nombre de spore observée sous le microscope.

2.4 Détection des composés volatils susceptibles d'être secrétés par les bactéries antagonistes :

Cette technique consiste à confronter indirectement la souche bactérien "*Bacillus subtilis*" avec le champignon phytopathogène "*Fusarium spp* " et évaluer l'action antagoniste grâce à l'action des substances volatiles sécrétées par la bactérie testée. Pour détecter les composés volatils susceptibles d'être secrétés par les bactéries antagonistes, le test suivant a été adopté : d'une part une boîte de Pétri contenant un milieu TSA a étéensemencée par la bactérie antagoniste *bacillus subtilis* et incubée pendant 24h à 30°C. Puis dans des conditions stériles son couvercle est remplacé par le fond d'une autre boîte contenant du milieu PDA (Annexe 1),ensemencé par une pastille de 8 mm de diamètre du champignon *Fusarium* ; les 2 fonds de boîtes superposés sont scellés avec du parafilm afin d'éviter toute déperdition de substances volatiles (Figure 34). Dans la boîte servant de témoin , l'inoculum bactérien est remplacé par de l'eau distillée stérile (**Fiddaman et Rossall , 1993 ; Montealegre et al . , 2003 ;**

Chaurasia et al . , 2005 ; Trivedi et al . , 2006) . L'incubation est faite à 28 ° C pendant 5 jours. Les composés volatiles sont ensuite identifiés par comparaison des spectres de masse et des indices de rétention linéaire (LTPRI) avec les références de la base de données et les indices de rétention linéaire publiés dans la littérature Après extraction et analyse de ces par chromatographie gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse

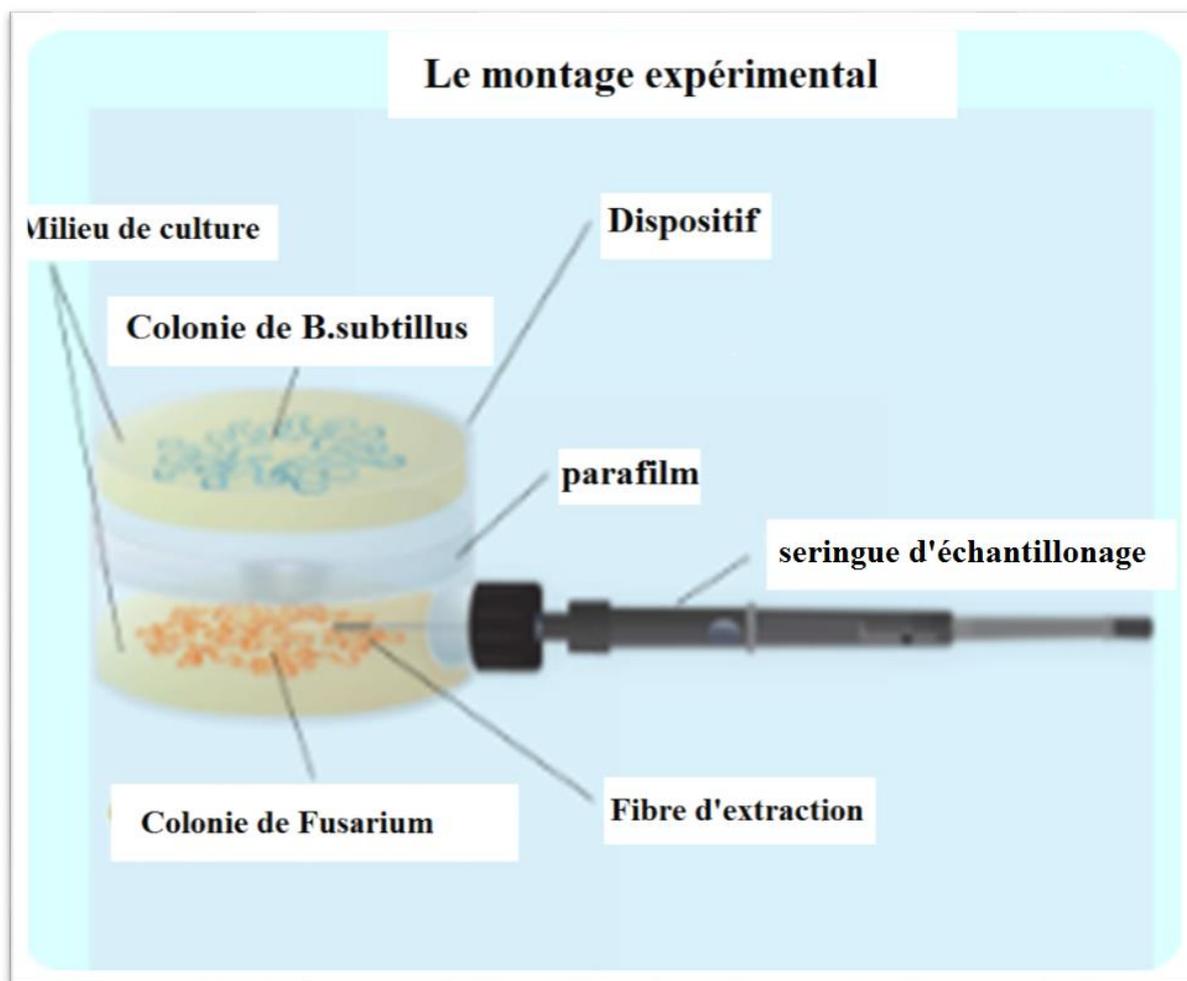


Figure 34 : le montage expérimental qui est effectuée pour détecter les composé volatiles

2.5 Effet des fractions extra et intracellulaire bactériennes sur la croissance mycélienne des espèces fongique

Les mycéliums des espèces fongiques ont été récupérés et dispatchés dans des tubes ependorfs. Puis, la concentration des tubes a été ajustée par le tris-HCl afin d'homogénéiser les concentrations. Ensuite, 800 µl de mycélium additionné à 100 µl de fraction intra ou extra cellulaire ont été mis dans un tube ependorf et incubés pendant 14h à 37°C. Enfin, l'effet des bactéries antagonistes sur la croissance mycélienne a été évalué par la mesure de la densité

optique à une longueur d'onde de l'ordre de 540 nm par un spectromètre. Sachant que les fractions extra et intracellulaires sont obtenues comme suit :

-Pour l'obtention de la fraction extracellulaire, la culture bactérienne est centrifugée pendant 15 min à 8000 tours par minute. Le surnageant est dispatché sur des tubes coniques et concentré avec 3 volumes d'acétone puis incubé pendant 4h à -20°C. Par la suite la solution est centrifugé pendant 45 min à 12000 tours, le culot est récupéré et additionné à 200µl de tris-HCl, (0,1M, pH8).

-Pour avoir la fraction intracellulaire, le culot est lavé avec une solution de NaCl (M=1%) puis le culot est mélangé avec 800µl de TEP pH7.5, 25 mM. Par la suite, le culot a subi une sonication, suivie d'une centrifugation pendant 30 min à 12000 rpm, ce qui aboutit à un surnageant qui constitue la fraction intracellulaire.

2.6 Test d'antagonisme *in vivo* sur des épis de Maïs :

Les études précédentes a permis de montrer les capacités antagonistes *in vitro* de quelques souches bactériennes « *bacillus subtilus* » contre des champignons phytopathogènes « *F .culmorum*, *F .pseudograminearum* »

Cependant, les résultats des expériences réalisées *in vitro* ne représentent pas toujours les réalités naturelles. En effet, plusieurs auteurs ont montré que des microorganismes ayant montré un fort pouvoir antagoniste *in vitro*, ne présentent plus d'intérêt une fois retournés dans L'*in vivo*. Ce fait, peut s'expliquer par plusieurs raisons dont le manque d'adaptation au milieu dans lequel ils sont introduits, l'inefficacité des antibiotiques secrétés ; ces derniers sont métabolisés et par conséquent n'atteignant pas leurs cibles.

Il apparait donc nécessaire de vérifier l'action antagoniste des microorganismes que nous avons sélectionnés « *bacillus subtilus* » sur le « *F .culmorum et F .pseudograminearum* » *in vivo*.

- **Condition d'expérimentation :**

Une désinfection de la semence a été réalisée selon la technique de **Messiaen et al.,(1991)**, les épis du Maïs sont désinfectées au préalable par un trempage dans l'alcool à 70% pendant 1 min puis rincées abondamment à l'eau distillée stérile (**Benhamou et al., 1997**), puis dans une solution de l'hypochlorite de sodium à 2% pendant 10 min , puis rincées quatre fois à l'eau distillée stérile et séchées par un papier filtre.

Puis des sites d'inoculation ont été créés à l'aide d'un emporte-pièce stérile. Les sites d'inoculation ont été créés de telle façon qu'ils ont la même surface sachant que le même nombre de site a été créé pour chaque épi.

- **Production de la suspension sporale du champignon :**

Les spores des deux champignons phytopathogène sont obtenues en inondant une culture de 14 jours sur milieu PDA (incubée à 28 ° C) avec 10 ml d'eau distillée stérile, les conidies sont délogées en grattant la surface du milieu avec le bout d'une pipette Pasteur stérile. Le liquide résultant est filtré à travers 4 couches de mousseline autoclavée (toile de coton) pour éliminer les débris du mycélium et du milieu. Le filtrat obtenu contenant les spores est lavé 2 fois avec de l'eau distillée stérile et la suspension sporale est centrifugée à 1000 g pendant 5 minutes. La concentration des conidies est estimée à l'aide une cellule de Malassez et ajustée à la concentration voulue (5.10^3 spores / ml) en y rajoutant de l'eau distillée stérile (Omar et al., 2006).

- **Production de la suspension bactérienne :**

Des boîtes de Pétri contenant le milieu nutritif gélosé sontensemencées en stries et incubées pendant 24 h à 30 ° C. Les boîtes sont ensuite inondées avec 10ml d'eau distillée stérile puis grattées avec une pipette Pasteur stérile, la suspension récupérée est homogénéisée par agitation à l'aide d'un vortex. Des flacons contenant 50 ml d'YPG (Annexe 1) sont inoculés avec 100 µl de l'inoculum bactérien et incubés à 30 ° C pendant 48 h (Omar et al. 2006).

- **Inoculation :**

- Inoculation bactérienne :**

A partir de culture conservées sur milieu King B, les souches bactériennes ont été purifiées avec plusieurs repiquages à 37°C pendant 24 h. A l'aide d'une anse de platine stérile, la crème bactérienne âgée de 48 h est raclée délicatement et mise en suspension dans 600 ml de l'eau physiologique stérile, une bonne homogénéisation est pratiquée.

- Inoculation fongique :**

Afin de préparer l'inoculum nécessaire à l'infestation artificielle, *F. culmorum* et *F. pseudograminearum* été cultivé sur le milieu PDA gélosé. Les cultures obtenues sont raclées et mises en agitation dans l'eau physiologique stérile pendant 2 jours (Tello-marquina et Alabouvette, 1984).

Cette suspension a été ajusté par l'eau physiologique stérile à une concentration de 0.15 à 0.17 conidies/ml, une quantité de 20 ml de cette suspension a été appliqué dans chaque lésion (**Liu et al. 2008**).

L'inoculum fongique est appliqué après quatre jours de l'application de l'inoculum bactérien

Les traitements effectués :

- (A) épis inoculés par le champignon C1.
- (B) épis inoculés par C1 et la bactérie J9.
- (C) épis inoculés par C1 et la bactérie SR146.
- (D) épis inoculés par le champignon G2.
- (E) épis inoculés par G2 et la bactérie J9.
- (F) épis inoculés par G2 et la bactérie SR146.

Le taux d'infestation des épis de Maïs a été déterminé par le comptage des grains de maïs infectés par rapport à la totalité des grains par épi. De plus, le pourcentage de la réduction de la fusariose des épis de Maïs a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$R(\%) = (A - B/A) * 100$$

Avec :

- A est le diamètre de la lésion enregistré dans les épis non traités inoculés uniquement par le pathogène
- B le diamètre de la lésion dans les épis traités par l'antagoniste.

2.7 Dosage des mycotoxines dans des grains infestés :

Ce test a porté particulièrement sur le dosage du déoxynivalenol (DON). Il s'agit de la trichothécène la plus fréquemment associée à la fusariose de l'épi en Tunisie. La production du DON par ces espèces dans des échantillons de grains de maïs infestés a été estimée au moyen d'un kit ELISA (enzymelinked immunoassay). Généralement, cette méthode permet de visualiser une réaction antigène anticorps grâce à une réaction colorée produite sur un substrat, d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps. Avant l'analyse, des échantillons de 200 g de grains ont été broyés et divisés en sous-échantillon de 5 g. Ensuite, 25 ml d'eau distillé stérile ont été ajoutés pour chaque sous-échantillon. Le mélange a été d'abord agité vigoureusement pendant 3 minutes, ensuite filtré sur papier filtre Whatman. Cinq microlitres de chaque filtrat ont été utilisés pour le test ELISA. Les standards et les échantillons ont été

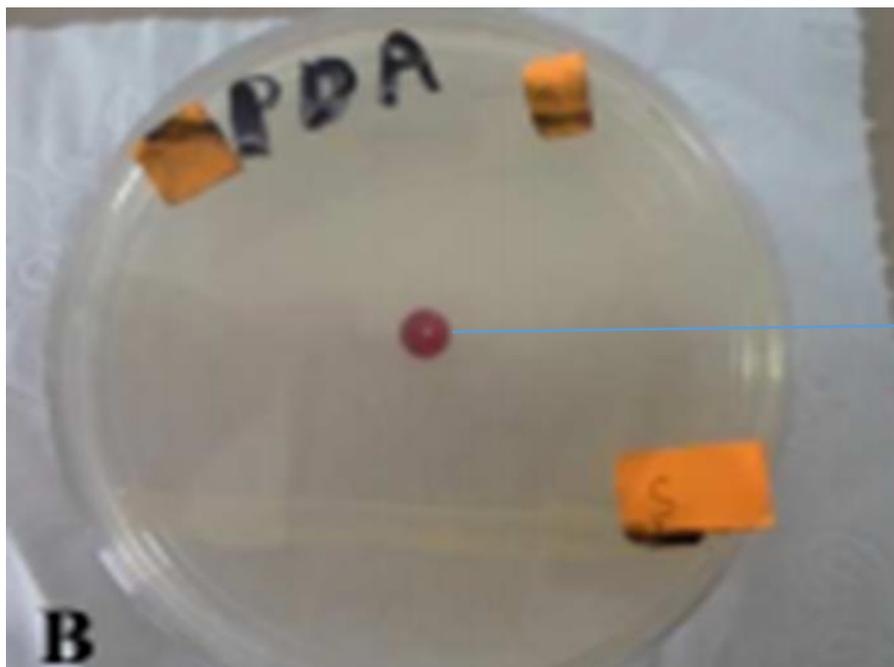
analysés suivant les instructions du fournisseur RIDASCREEN® DON Kit (R- Biopharm AG, Darmstadt, Germany). Sachant que ce kit détermine les concentrations de DON, 3AcDON, et 15-AcDON combinées. Ce test a été réalisé en plusieurs étapes. Au début, 50 µL de chaque solution étalon ou échantillon ont été ajoutés dans les puits correspondants. Puis, 50 µL du conjugué enzymatique et 50 µL de solution d'anticorps anti-deoxynivalenol ont été ajoutés. Le mélange a été ensuite agité doucement, en effectuant un mouvement circulaire de la plaque, et incubé pendant 30 mn à la température ambiante (20-25 °C). Pour retirer tout le liquide des puits, ces derniers ont été vidés en renversant la plaque de microtitration, sur du papier absorbant. Par la suite, les puits ont été remplis avec 250 µL de tampon, puis vidés de nouveau, et l'opération a été répétée deux fois. Les puits ont été remplis de nouveau par l'ajout de 100 µL d'une solution substrat/chromogène. Le mélange a été agité doucement et incubé à l'obscurité et à la température ambiante (20-25 °C) pendant 15 mn. Le test a été terminé par l'ajout de 100 µL de solution stop dans chaque puits, en agitant doucement et en effectuant un mouvement circulaire sur la paillasse. Enfin, dans les 10 mn suivantes, l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Multiskan Ascent® software (Labsystems, Helsinki, Finland) à une densité optique $\lambda=450$ nm.

➤ **Article 02 :**

L'expérience a été réalisée par la méthode d'appariement des colonies. Pour cela, le pathogène *colletotrichum graminicola* a été cultivé en milieu PDA pendant sept jours et les rhizobactéries *Bacillus* et *Pseudomonas* ont été réactivé en milieu de culture NA (Nutrient-Agar) pendant 48 heures. Puis des disques de mycélium de la pathogène (Figure 35) ($\varnothing = 9$ mm) prélevé à l'extrémité des colonies ont été placés individuellement dans le centre de boîtes de Pétri contenant du milieu PDA (Figure 36), où un cercle de croissance bactérienne a été préalablement tracé le long du bord de celui-ci, à l'aide d'une tige de verre. Et des plaques contenant un seul disque de mycélium pathogène ont été utilisées comme témoins, en l'absence des rhizobactéries. Les plaques ont été conservées dans un incubateur de type BOD à une température de 28 ± 2 °C et photopériode lumière/obscurité de 12 h pendant sept jours. La conception expérimentale était entièrement avec cinq traitements, constitués de cinq rhizobactéries (B23, B14, P22, P23 et P41) et témoin et cinq répétitions. Les évaluations ont été faites quotidiennement, commençant 24 heures après la configuration du test, mesurant la croissance radiale (mm) des colonies de pathogènes, jusqu'à ce terminer sa croissance dans le traitement témoin.



Figure 35 : prélèvement des disques mycéliens



Disque de champignon
colletotricum
graminicola

Figure 36 : Méthodes d'ensemencement des souches

2.8 Analyse statistique :

➤ Article 1 :

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel **GraphPad Prism (2009)** pour l'analyse de la variance en appliquant le test Anova traitement Dunnet (bilatéral). Toutes les analyses statistiques ont été faites pour un intervalle de confiance de 5 %.

Résultats Et Discussions

1 Résultats d'isolement des microorganismes pathogènes :

➤ Article 1 :

• Répartition du FHB en Tunisie :

Parmi les 98 champs prospectés, 45 ont montré des symptômes de la FHB (fusarium head blight). Ces cultures de blé infectées étaient limitées au subhumide et au semi-aride supérieur, régions où un pourcentage élevé de champs malades était enregistré (Figure 32, Tableau 8). Dans ces domaines respectifs, 78 et 80 % des champs échantillonnés présentaient des symptômes de FHB avec une incidence allant de 2 à 68% des noyaux échantillonnés. Les symptômes visuels ont ensuite été confirmés par l'isolement fongique et leur identification.

Tableau 8 : Répartition de la fusariose de l'épi dans les régions climatiques prospectées

Type de climat	Nombre des champs prospectés	pourcentage des champs infestés
Climat subhumide	37 champs	75,7
Climat semi-aride supérieur	21 champs	80,9
Climat semi-aride moyen	20 champs	0
Climat inférieur semi-aride	20 champs	0
Total	98	64,4

Cette enquête a montré que la fusariose n'était pas répandue en Tunisie en 2004 et était limitée à deux régions climatiques, les zones subhumides et semi-arides supérieures où 78% des champs prospectés présentaient des symptômes de fusariose. Or, ces régions représentent plus de 60% de la superficie céréalière en Tunisie. L'irrégularité des précipitations et la prédominance du système de culture pluviale en Tunisie sont généralement des conditions favorables à la pourriture du collet (**Gargouri et al., 2001**). L'apparition de la FHB en 2004 a pu être favorisée par des conditions climatiques exceptionnelles, notamment une humidité relative élevée lors de la floraison fin mars.

- **Identification des espèces pathogènes isolés :**

Cette étude a révélé que 41 % des grains analysés prélevés sur les 45 épis de blés malades cultures ont été infectées par les espèces de genre *Fusarium*. D'après la morphologie des colonies, ces souches peuvent être regroupées en quatre espèces : *F. culmorum*, *F. graminearum* et *F. avenaceum*. *F. pseudograminearum* Souvent les trois différentes espèces pourraient être récupérées à partir du même champ.

Les caractéristiques microscopiques des souches monoconidiales cultivées sur CLA confirme ces observations. Cependant, les souches de *F. graminearum* pourraient produire des périthèces sur CLA.

Ainsi, toutes ces souches ont été classées dans le groupe 1 de *F. graminearum* comme décrit par **Burgess et al. (1994)** ou *F. pseudograminearum* comme récemment nommé par **Aoki et ODonnell (1999)**.

Les *F. pseudograminearum* sont caractérisées par un mycélium pigmenté ou non, aérien ou ras. L'observation de la pigmentation est réalisée au niveau du mycélium aérien et sur le mycélium situé au contact direct de la gélose (cette dernière observation s'effectue en retournant la boîte)(Figure 37).

De plus, les spores parfois groupées en sporodochies (fructifications dans laquelle la masse conidienne est supportée par un stroma couvert de courts conidiophores), peuvent donner à la colonie un aspect « gras ».

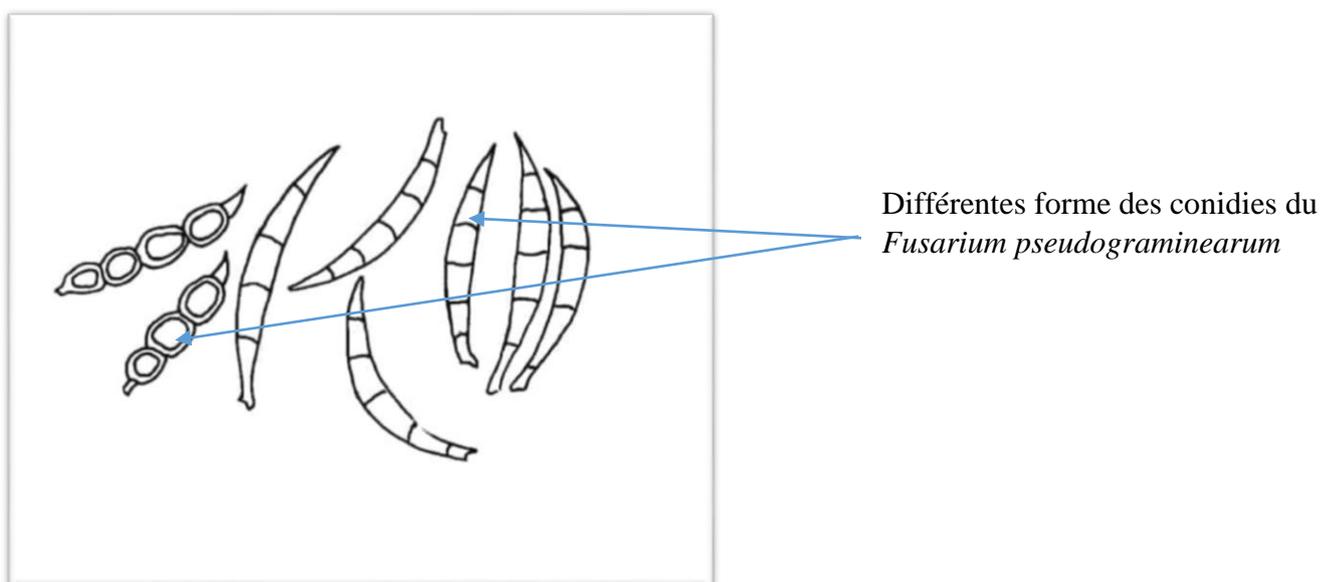


Figure 37 : la forme des conidies du *Fusarium pseudograminearum*

Pour les *F.culmorum*, la morphologie de ces colonies ne permet pas à elle seule de l'identifier : le mycélium aérien est lâche, la pigmentation varie du rouge carmin au brun.Ce champignon possède des macroconidies souvent abondantes réparties sur le mycélium en microsporodochies, ainsi que quelques chlamydo-spores volumineuses, sans rigidité apparente, réparties sur les hyphes.

Pour ce champignon, aucune caractérisation ne peut être réalisée par simple observation de la morphologie des colonies qui présentent des caractéristiques identiques. On note souvent, la présence d'un mycélium aérien compact de couleur rosée.La vitesse de croissance des souches varie à 25 °C, entre 10,6 et 11 mm par jour.Les macroconidies se développent surtout au contact du milieu gélosé, sous le mycélium aérien et sont peu nombreuses. Elles sont très caractéristiques : de courbure parfaite, une extrémité terminale pointue et sont constituées de 5 à 6 cellules. De taille assez imposante (27-40 µm), leur plus grande largeur (4-6 µm) se situe dans leur partie médiane. Il arrive que l'on observe sur les macroconidies, des chlamydo-spores en forme de ballonnets intercalaires d'apparence très rigide (**Messiaen et al, 1976**) (Figure 38).

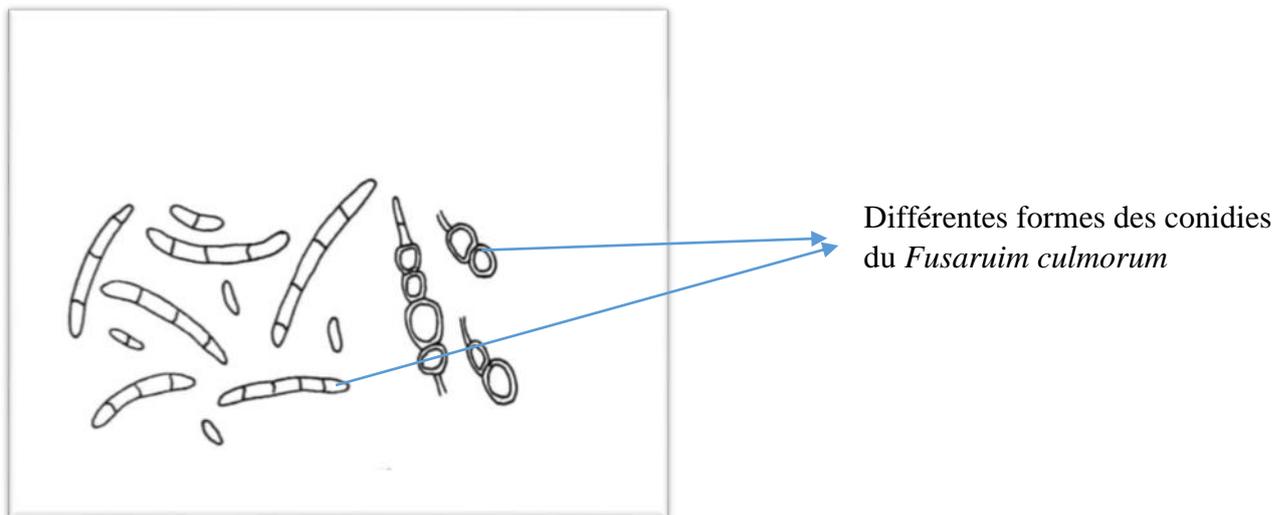


Figure 38 : la forme des conidies du *Fusarium culmorum*

- **Identification moléculaire :**

Par ailleurs, le couple d'amorces FC 01F/FC 01R a amplifié la taille de fragment attendue de 570 pb décrit par **Nicholson et al. (1998)** en tout isolats sélectionnés de *F. culmorum*.

De plus, les amorces FP1-1 et FP1-2 amplifiaient un fragment spécifique de 520 pb tel que décrit par **Aoki et ODonnell (1999)** dans toutes les souches de *F. pseudograminearum* (Figure 39).

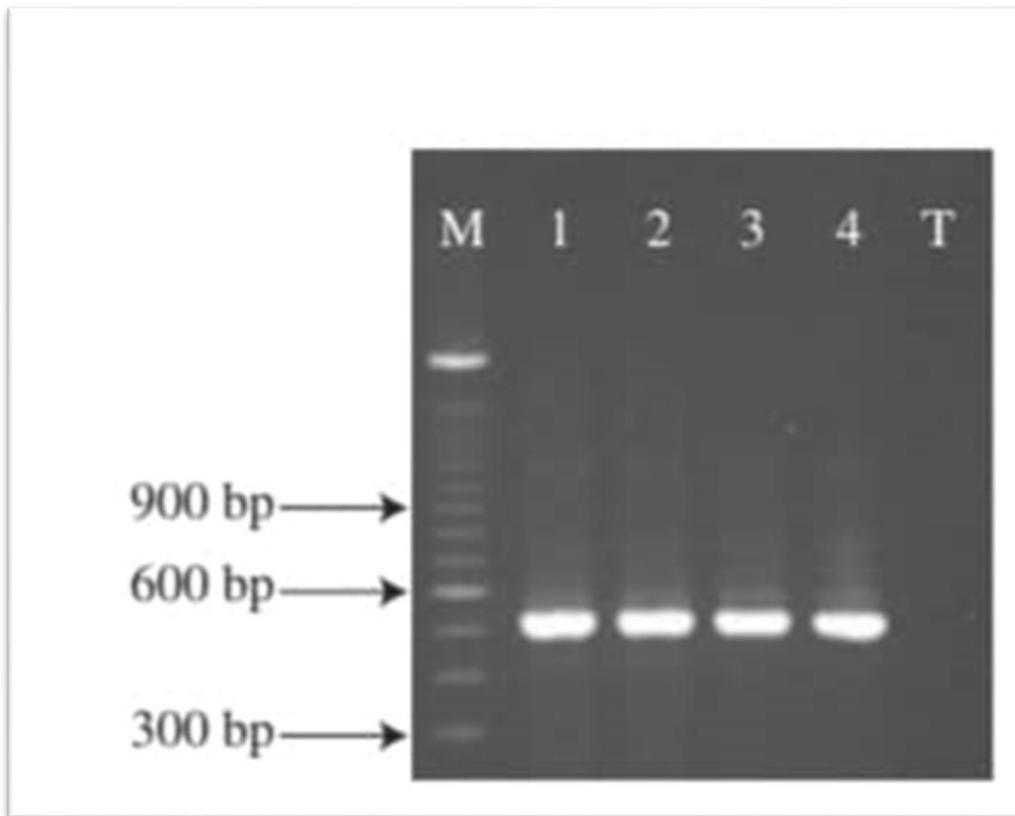


Figure 39 : Amplification de l'ADN de quatre isolats de *Fusarium pseudograminearum* .piste m : marqueur de taille de 100 pb (invitrogen, carls-bad, États-Unis) : pistes 1-4 amplifiée avec l'ensemble d'amorces FP1-1/FP1-2 *Fusarium pseudo* spécifique, 523 pb de paire

L'analyse de ces résultats a montré que *F. culmorum* était l'espèce le plus abondant . il a été isolé à une fréquence de 26 %. Les fréquences des espèces et les pourcentages de récupération des espèces dans les différents champs ont été résumés dans Tableau 9.

Tableau 9 : Espèces contaminants exprimées en pourcentage du nombre total d'espèces isolées et en pourcentage des champs contenant l'isolat

Espèces	Pourcentage total des espèces	Pourcentage du champ contenant l'isolat
<i>Fusarium culmorum</i>	26	55,5
<i>Fusarium pseudograminearum</i>	9	44,4
<i>Fusarium avenacem</i>	1 ,5	17 ,7

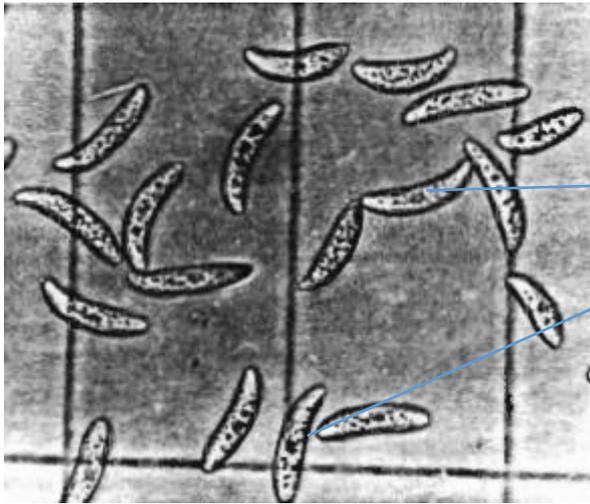
une diminution de la fréquence de *F. culmorum* a également été observée dans d'autres régions du monde comme les Pays-Bas (**Waalwijk et al., 2003**), la France (**Ioos et al., 2004**) et le Royaume-Uni (**Jennings et al., 2004**). De nombreux facteurs pourraient contribuer à ces résultats, tels que les conditions environnementales, les pratiques de culture et le traitement fongicide (**Burgess et al., 1975**).

Dans les pays du nord de la Méditerranée, *F. graminearum*, *F. culmorum* et *F. avenaceum* sont généralement les espèces les plus communes. Cependant, dans cette étude, les critères morphologiques et moléculaires n'ont pas permis de classer toute souche récupérée des grains comme *F. graminearum*.

F. pseudograminearum a également été isolé à partir de grains de blé au cours de l'enquête. Il a été récupéré sur plus de 40 % du champ prospecté. Cette espèce est principalement associée à la pourriture du collet du blé et de l'orge (**Burgess et al., 1975**). Il a également été isolé à partir de bases de tiges de blé en Tunisie (**Gargouri et al., 2001**). Néanmoins, il a été signalé comme la cause de la fusariose dans de nombreuses régions d'Australie (**Burgess et al., 1987 ; Manning et al., 2000 ; Akinsammi et al., 2004 ; Tan et al., 2004**).

➤ **Article 2 :**

En culture pure, le mycélium présente des aspects variables. Généralement caractérisé par des thalles présentant un mycélium aérien ras, très peu développé, presque adhérent à la surface du milieu de culture. Certains isolats de l'espèce *C. graminicola* ont la particularité de produire un pigment diffusant dans le milieu de culture dont le thalle est fortement coloré violet. Les conidies de cette espèce sont typiquement allongées régulièrement arquées aux extrémités arrondies mais effilées, hyalins et unicellulaires. **Von ARX et MULLER (1954)** donnent 22-38 um x 4-7um comme dimensions moyennes .



Différentes forme des conidies de *colletotrichum graminicola*

Figure 40 : la forme des conidies de *colletotrichum graminicola*

2 Résultats d'antagonisme *in vitro* :

- **Article 01** : Les résultats du test d'antagonisme *in vitro* ont montré une inhibition de la croissance fongique. Cette inhibition est variable selon la souche bactérienne et l'isolat de *Fusarium* testé (Figure41) :

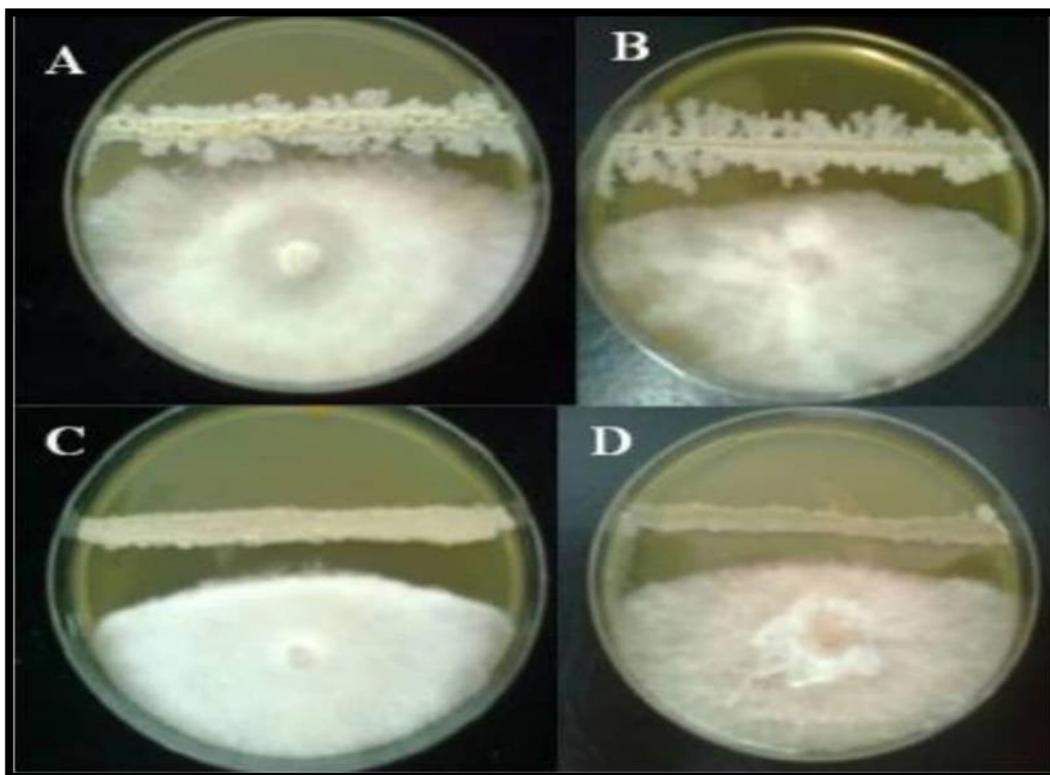


Figure 41 : Test d'antagonisme direct *in vitro*

Les résultats de ce test ont montré globalement que parmi les sept bactéries testées, quatre souches bactériennes ont révélé un pouvoir d'inhibition de croissance à savoir : J9, SR-146, M1-20 et K1-11 avec des taux d'inhibition allant de 11.66 % à 58.33 % (Figure 42). Sur le milieu TSA, les meilleurs taux d'inhibition des isolats *F. culmorum* et *F. pseudograminearum* ont été marqués par la souche M1-20 avec des taux de l'ordre de 55% et 58% respectivement. Alors que sur le milieu PDA, les taux d'inhibitions de la croissance fongique les plus élevés ont été marqué par la bactérie J9.

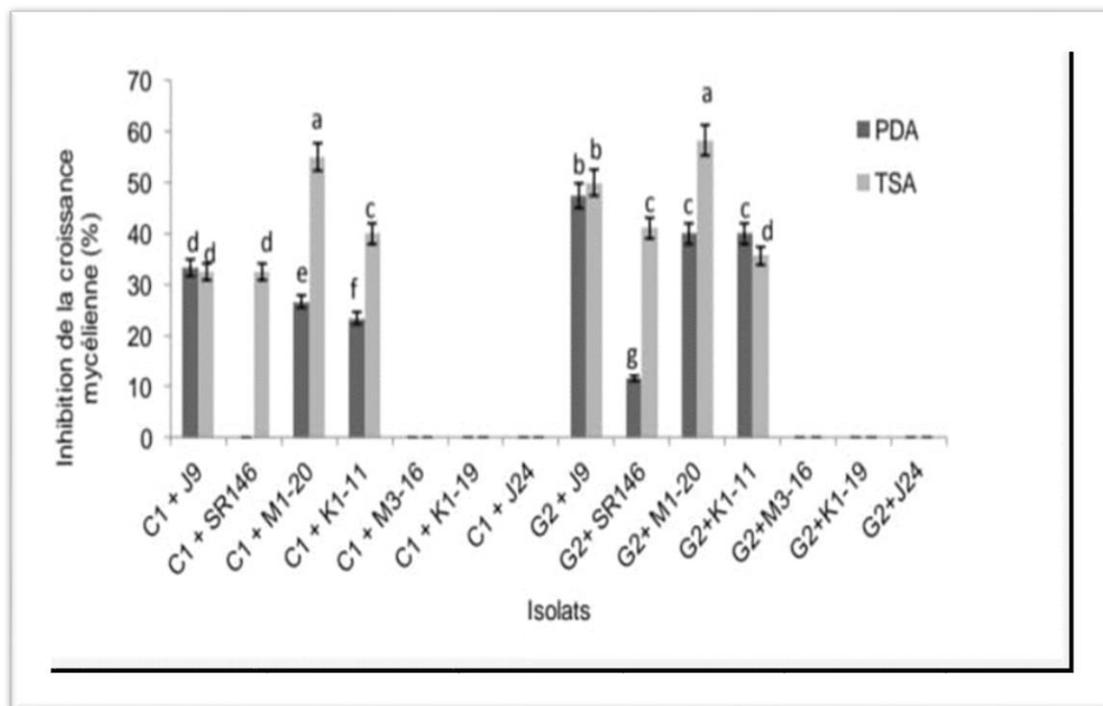


Figure 42 : Effets des bactéries antagonistes sur la croissance mycéliennes des deux espèces de *Fusarium* sur les milieux de culture PDA et TSA. Avec C1 : *F.culmorum*, G2 : *F.pseudograminearum*.

Ce test a montré que le pouvoir d'inhibition ne dépend pas uniquement de la bactérie ou du pathogène mais également du milieu de culture. Sur le milieu de culture PDA *bacillus subtilis* est sans effet sur la croissance mycélienne de *F. culmorum* mais elle a montré une faible inhibition de croissance vis-à-vis de *F. pseudograminearum*. Alors que sur le milieu TSA *bacillus* a manifesté un fort antagonisme envers *F. culmorum* et un pouvoir d'inhibition de croissance de *F. pseudograminearum* plus élevé que celui enregistré sur le milieu PDA. Ces résultats peuvent être expliqués du fait que les composants nutritionnels du milieu jouent un rôle important dans la production des métabolites antifongiques par les *Bacillus spp* (Hebbar et al, 1992). La différence dans l'effet inhibiteur de croissance du mycélium peut être due au

milieu de croissance des deux antagonistes, ainsi le milieu du test peut influencer le degré de l'antibiose manifesté par les antagonistes (Cavallieri et al, 2005).

3 Les résultats des autres expériences qui sont fait par les auteurs de l'article 1 :

3.1 Effet de l'antagoniste sur le nombre et la germination des spores :

Les résultats de ce test ont montré que parmi les bactéries testées, les souches J9 et SR146 ont réduit considérablement le nombre de spores. D'ailleurs la souche SR146 a inhibé complètement la sporulation de *F. culmorum*. Les autres souches sont dotées aussi d'une activité antifongique variable à l'exception de la souche J24 qui a réduit légèrement le nombre de spores. La réduction de nombre de spores peut être en relation avec la quantité de substances antifongiques sécrétées par les bactéries antagonistes qui inhibent la division des spores et leur germination.

Les observations microscopiques ont montré aussi l'efficacité des bactéries antagonistes sur la germination des spores des deux isolats de *Fusarium*. Au bout de 24 h et sans traitement bactérien les spores ont germé pour donner naissance aux hyphes mycéliens qui s'allongent et s'enchevêtrent (Figure 43, A).

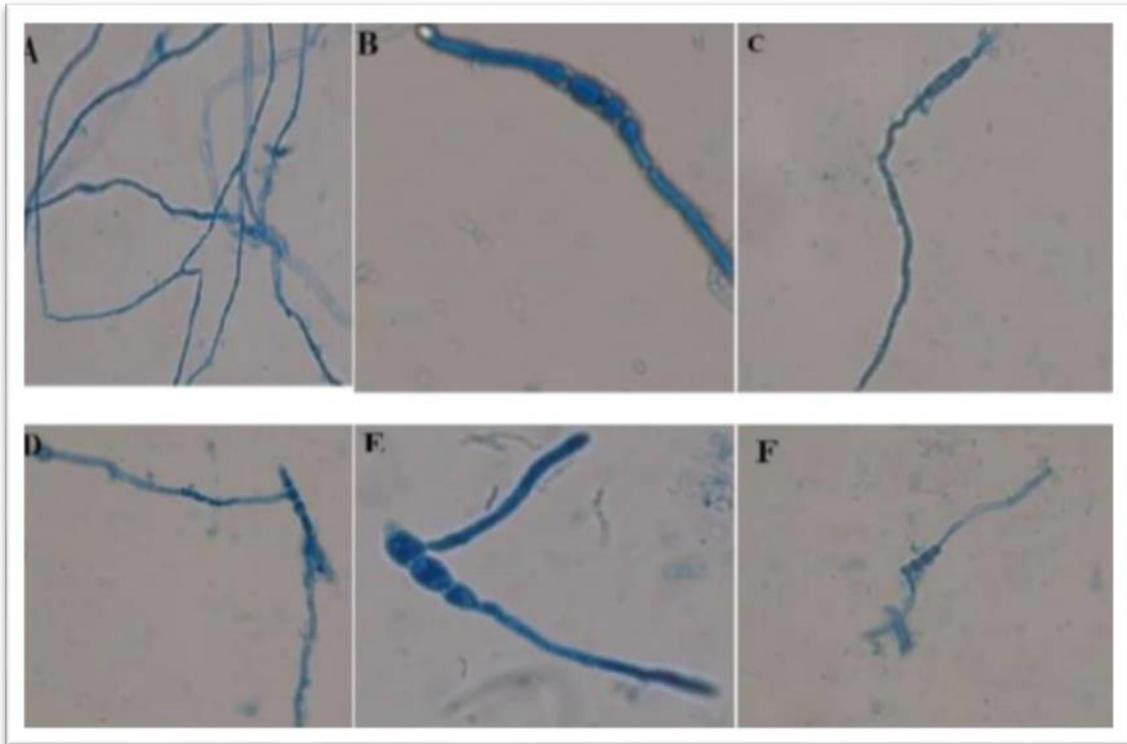


Figure 43 : Observation microscopique montrant l'effet des bactéries antagonistes sur la germination des spores des deux espèces de *Fusarium* après 24h d'incubation

- (A) Témoin C1
- (B) Spores de C1 additionnées d'une suspension bactérienne de J9
- (C) Spores de C1 additionnées d'une suspension bactérienne de SR-146
- (D) Témoin G2
- (E) Spores de G2 additionnées d'une suspension bactérienne de J9
- (F) Spores de G2 additionnées d'une suspension bactérienne de SR-146.

Cependant, les bactéries antagonistes notamment J9 et SR146 ont entravé la germination des spores de C1 et G2 (Figure 43, B, C, E, F). L'observation microscopique a montré aussi q inhibitions de la croissance mycélienne supérieure à 45 % par antagonisme entre l'isolat de *B. subtilis* contre plusieurs champignons phytopathogènes du sol, tels que *Fusarium spp.*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus sp.* Par la production de métabolites du type lipopeptidique (Desjardin et al., 2004). et après 24h d'incubation dans l'eau glucosé à 5%, les spores de *F.culmorum* ont fortement germé alors que celles de *F.pseudograminearum* ont moyennement germé (Figure 43, A, D). Les spores jouent un rôle primordial dans l'incidence et la dissémination de la fusariose de l'épi de maïs (Desjardin et al., 2004). En effet, Réduire le nombre de spores et/ou leurs germinations, c'est réduire la propagation de la maladie.

3.2 Effet des composés volatils secrétés par les bactéries antagonistes :

L'essai de la culture des espèces de *Fusarium* en présence des agents antagonistes montre l'aptitude de ces agents à diminuer le développement des champignons. D'ailleurs, les résultats de ce test ont montré que la souche SR146 a réduit la croissance de *F.culmorum* de 45 % et *F.pseudograminearum* de 51 % (Figure 44).

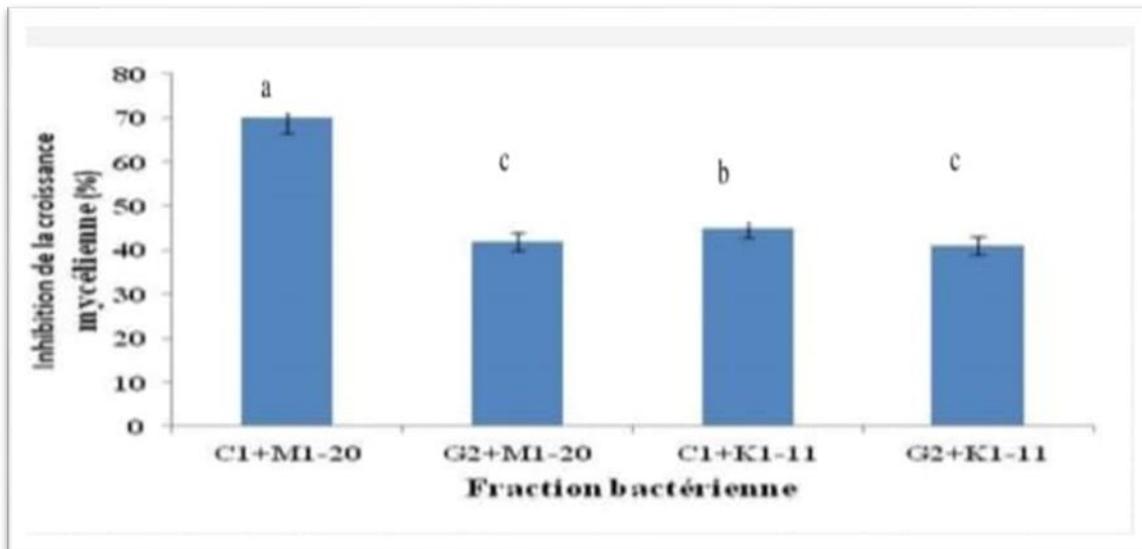


Figure 44 : Effet des antagonistes bactériennes sur la croissance mycélienne des isolats *F.culmorum* (C1) et *F.pseudograminearum* (G2) (des souches : M1-20, K1-11).

La souche J9 a réduit la croissance de *F.culmorum* de 55 % et *F.pseudograminearum* de 52 %. La souche SR146 a réduit la croissance de *F.culmorum* de 45 % et *F.pseudograminearum* de 51 % (Figure 45).

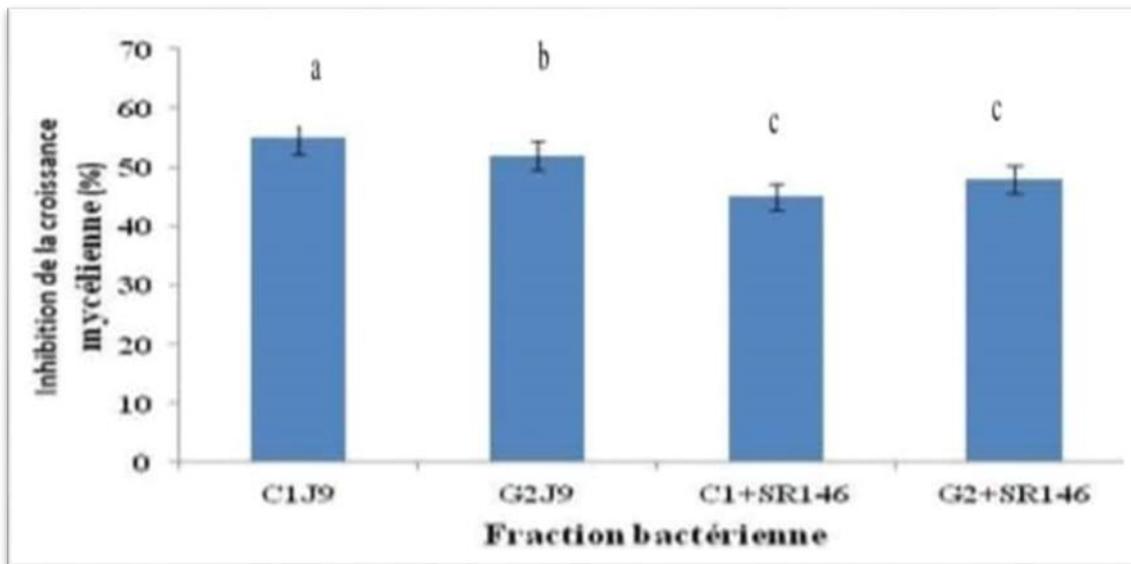


Figure 45 : Effet des antagonistes bactériennes sur la croissance mycélienne des isolats *F.culmorum* (C1) et *F.pseudograminearum* (G2) (des souches : J9, SR46).

Les résultats de ce test ont montré qu'à part, les substances antifongiques diffusibles, les *Bacillus spp* produisent également des substances volatiles capables d'inhiber la croissance de *Fusarium*. Ces résultats concordent avec plusieurs travaux montrant la capacité des espèces du genre *Bacillus* à produire des composants volatiles antifongiques (des alcools, les cétones, les aldéhydes, les pyrazines, les esters, les pyridines et les composés benzéniques ...).

Les observations microscopiques ont montré que les composants volatils ont causé des aberrations au niveau des structures mycéliennes de *Fusarium* : des lyses au niveau des hyphes, une vacuolisation ainsi qu'une granulation des structures mycéliennes et un gonflement anormal des conidies.

3.3 Test d'antagonisme *in vivo* sur des épis de maïs :

Les bactéries qui ont manifesté une activité antifongique *in vitro* ont été utilisées pour des essais *in vivo* sur des épis de maïs. Les résultats de ce dernier test ont montré que les souches bactériennes sélectionnées ont permis la réduction de la propagation du mycélium du pathogène (Figure 46). En effet, la souche J9 a réduit la maladie de l'ordre de 64.22 % pour les épis inoculés par *F. culmorum* (C1) et de l'ordre de 68.57 % pour ceux inoculés par *F. pseudograminearum* (G2).

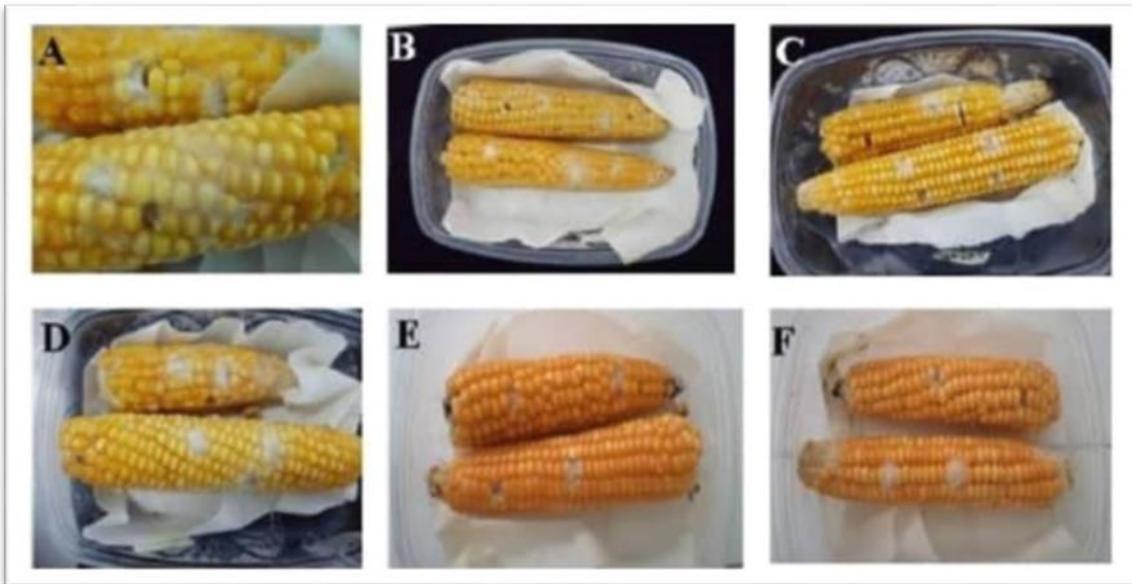


Figure 46 : Effet des bactéries antagonistes sur la fusariose d'épi de maïs *in vivo*

L'espèce SR-146 s'est avérée également efficace contre la maladie qui se trouve atténué de 60% quand les épis ont été inoculés par C1 et de 50% pour les épis inoculés par G2. Cependant l'espèce M1-20, hautement active *in vitro*, a réduit de 43 % et de 40 % la maladie quand les épis ont été inoculés respectivement par C1 et G2. De même la souche K1-11, a réduit moyennement la maladie (Figure 46). L'analyse statistique des résultats obtenus confirme l'effet réducteur exercé par les bactéries antagonistes sur l'intensité de la fusariose du maïs. La réduction de la maladie a été hautement significative pour toutes les bactéries testées pour le cas de *F. culmorum*. Alors que pour la souche *F. pseudograminearum*, l'effet réducteur exercé par les bactéries antagonistes a été variable allant d'une réduction non significative à une réduction hautement significative. Il est généralement connu que l'expression d'antagonisme des micro-organismes envers un pathogène dans un milieu de culture ne peut pas être évidemment garantie sous serre ou en plein champ. En effet, il a été

démonstré que la corrélation entre l'antibiose *in vitro* et le contrôle biologique *in vivo* est fréquemment incohérente (Reddy et al, 1993).

Bevino et al (1998) ont obtenu une faible corrélation entre les résultats obtenus *in vitro* et ceux trouvés sous serre quand ils ont voulu évaluer la capacité des *Bacillus subtilis* à réduire *F. moniliforme* et *F. proliferatum* dans le maïs. Cependant, la présente étude plaide en faveur d'une importante corrélation entre l'antagonisme obtenu *in vitro* et la capacité de *B. subtilis* à inhiber la colonisation de Maïs par les espèces de *Fusarium*. L'étude menée par Cavalgieri et al, (2005) a montré l'efficacité de *B. subtilis* CE1 *in vitro* ainsi qu'*in vivo* dans la réduction de *F. verticilloides* et *F. graminearum* dans les grains de Maïs. Les résultats des travaux de Palazzini et al (2007) concordent avec nos résultats, en effet les espèces de *Bacillus* sélectionnées ont réduit la sévérité de la fusariose de Maïs de plus de 71% sous serres mais ces bactéries n'ont pas réduit l'incidence de la maladie. Cette remarquable réduction de sévérité de la maladie est similaire à celle rapportée par Da Luz (2000) en utilisant *Bacillus megatherium* et *Bacillus subtilis*.

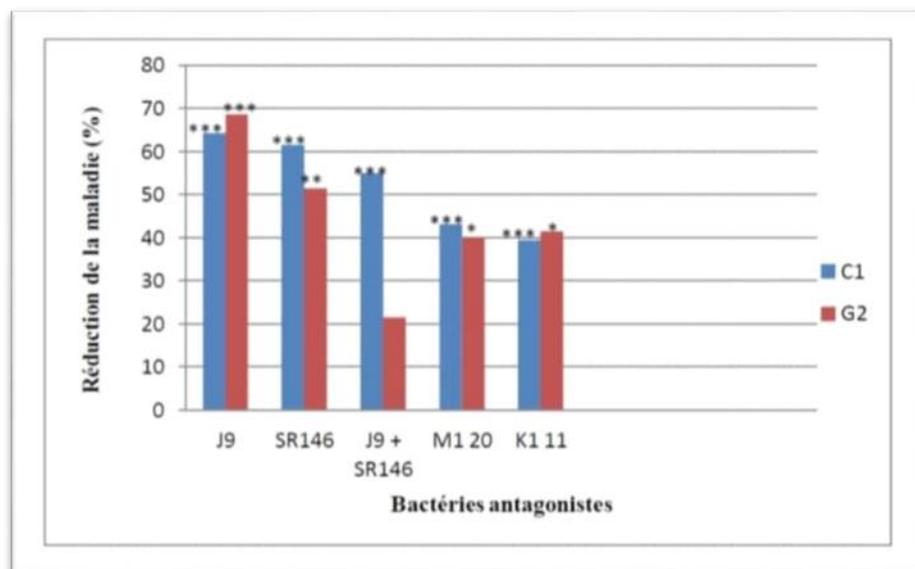


Figure 47 : Effet des bactéries antagonistes sur la fusariose du Maïs.

3.4 Dosage du déoxynivalenol (DON) dans des grains infestés :

. Les résultats ont montré que les teneurs en trichothécènes de type DON ont varié selon la bactérie antagoniste de 6.2 à 11.5 ppm. Des travaux ultérieurs réalisés par Khan et al (2004) ont montré que le contenu des grains de maïs a été rarement réduit par les traitements biologiques même si la sévérité de la maladie a été significativement réduite par les espèces : *Bacillus subtilis* AS433, *B. subtilis* AS434, *B. subtilis* OH131.1. Ces données s'opposent aux

résultats trouvés au cours de cette étude qui ont montré que la bactérie *Bacillus subtilis* J9 a considérablement réduit le taux des DON dans les grains de maïs. De plus, les résultats trouvés sont en concordance avec ceux de **Palazzini et al (2007)** qui a montré que l'antagonisme exercé par la présence de bactéries spécifiques (*Bacillus spp*) peut influencer la production de mycotoxines. En fait, parmi 22 isolats testés 50% étaient capables de diminuer le taux de DON à des niveaux indétectables dans les grains de maïs irradiés. Plusieurs études s'orientent vers la nécessité de lutter contre la croissance des champignons pathogènes de genre *Fusarium* afin de réduire la contamination des aliments par les mycotoxines secrétées par ce genre de champignons. Cette idée est contrariée par des études plus récentes qui ont mis en évidence le rôle des mycotoxines comme facteur de virulence qui favorise l'installation et la propagation du champignon pathogène. **Maier et al (2006)** met en évidence le rôle de DON dans la colonisation des épis de maïs.

4 Résultats de l'antagonisme *in vitro* de l'article 2 :

Il a été observé que tous les isolats de rhizobactéries testés présentent un effet antagoniste

Significatif sur la croissance mycélienne de *C. graminicola*, par rapport au témoin (Figure 48)

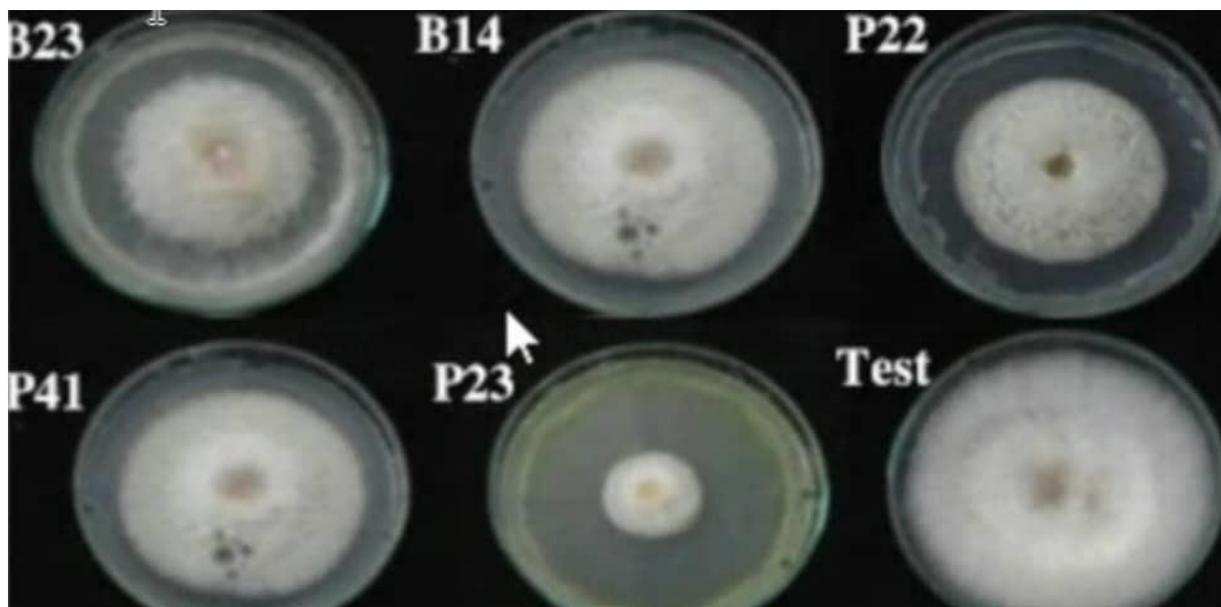


Figure 48: Croissance mycélienne de *Colletotricum graminicola* en présence de rhizobactéries

La croissance mycélienne de l'agent pathogène était de 18,98 mm, 29,65 mm, 30,43 mm, 34,17 mm et 34,32 mm en présence des isolats P23, P41, P22, B23 et B14, respectivement, alors que dans le traitement témoin, sa croissance était de 41,39 mm, supérieure donc à celle de la présence d'antagonistes. Cela indique l'inhibition *in vitro* de la croissance mycélienne

des agents pathogènes dans la présence d'antagonistes. Cependant, isolat P23, du genre *Pseudomonas*, était la rhizobactérie qui a démontré un plus grand potentiel antagoniste contre l'agent pathogène, se démarquant statistiquement des autres traitements, suivis de P41 et P22 et de B23 et B14, qui ne différaient pas statistiquement entre si dans les taux d'inhibition, mais différaient du traitement témoin.

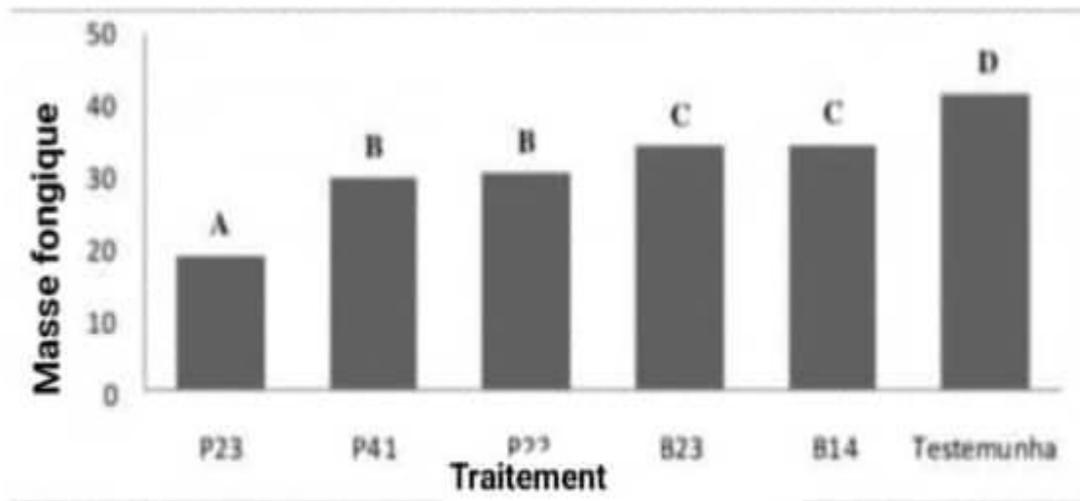


Figure 49 : Indice de vitesse de croissance mycélienne (IVCM) de *Colletotrichum graminicola* en présence de rhizobactéries.

Des résultats similaires à ceux rapportés dans la présente étude ont été décrits par **Kumar et Dubey (2012)**, où des bactéries du genre *Bacillus* produisent métabolites à potentiel inhibiteur sur les champignons tels que *Fusarium spp* et *Colletotrichum spp*. **Kuper et al. (2003)** ont démontré que l'inhibition de la croissance des agents pathogènes se produit par les rhizobactéries antagonistes, comme ceux des genres *Bacillus* et *Pseudomonas* (Figure 49), en général, agissent significativement soit par l'antibiose, par le parasitisme ou par la compétition pour les nutriments, ou tous les mécanismes simultanément.

Les rhizobactéries des genres *Bacillus* et *Pseudomonas* testées ont montré des niveaux différents d'inhibition de la croissance mycélienne *in vitro* de *Colletotrichum graminicola spp*. *Rhizobacterium P23*, du genre *Pseudomonas*, a provoqué une plus grande inhibition *in vitro* contre *C.graminicola*, montrant un potentiel d'utilisation dans les futurs programmes de lutte biologique contre l'antracnose foliaire du Maïs.

Conclusion

Les méthodes de lutte classiques (culturales, génétiques et chimiques) vis - à - vis des phytopathogènes présentent des limites et un manque de durabilité. Les PGPR sont utilisés comme une solution alternative ou complémentaire, qui semble assurer une efficacité durable. Induire et renforcer les mécanismes de défense propres d'une plante par l'application de ces agents biologiques est une nouvelle stratégie en matière de gestion indirecte des bioagresseurs. Les PGPR peuvent contrôler les maladies des cultures par leurs actions indirectes sur les phytopathogènes, en produisant des métabolites secondaires, antimicrobiens et / ou d'enzymes hydrolytiques et / ou par compétition trophique. Cette intervention par ces actions indirectes réduit l'effet des agents phytopathogène, et ainsi ils peuvent permettre de diminuer l'utilisation des pesticides, ce qui devrait encourager les efforts des recherches dans ce domaine.

Dans notre travail nous avons fait une synthèse à partir des travaux publiés portant sur l'utilisation des rhizobactéries dans le biocontrôle des maladies affectant le maïs dans deux régions (Brésil et Tunisie) .

La contamination des céréales par ces champignons pose un problème majeur pour les agriculteurs surtout que le rendement et la qualité du produit agricole peuvent être réduits. L'application des bactéries de genre *Bacillus* a inhibé la croissance des deux espèces de *Fusarium* : *Fusarium pseudograminearum* et *F. culmorum*. Les résultats du test de la double culture *in vitro* suggèrent que les métabolites antifongiques produits par ces bactéries sont à l'origine de l'inhibition de la croissance et la lyse des hyphes de *Fusarium*. Les bactéries antagonistes produisent aussi des composants volatils capables de réduire la croissance de *Fusarium*. Les bactéries antagonistes, des *B. subtilis* ont montré également une capacité à inhiber la germination des spores de *Fusarium* qui jouent un rôle primordial dans l'incidence de la fusariose de l'épi de maïs. Cette aptitude à réduire la croissance de champignon *in vitro* corrèle avec la capacité des bactéries antagonistes à réduire la maladie sur les épis de maïs. Le taux de DON dans les grains de maïs a été également significativement réduit quand les bactéries antagonistes sont appliquées. Ce travail a permis aussi d'explorer la capacité des bactéries du genre *Bacillus* en particulier les souches appartenant à l'espèce *B. subtilis* à prévenir la croissance des *Fusarium spp* producteurs de DON. Ainsi il est intéressant de caractériser les biomolécules qui sont à l'origine de l'inhibition de la croissance fongique. La détermination des conditions optimales de production et la purification de ces métabolites antifongiques semble également très intéressant.

Les rhizobactéries des genres *Bacillus* et *Pseudomonas* testées au niveau d'article 2 ont montré des niveaux différents d'inhibition de la croissance mycélienne in vitro de *Colletotricum graminicola*. Rhizobacterium P23, du genre *Pseudomonas*, a provoqué une plus grande inhibition in vitro contre *C.graminicola*, montrant un potentiel d'utilisation dans les futurs programmes de lutte biologique contre anthracnose foliaire du maïs.

En conclusion, Il est souhaitable de poursuivre les travaux concernant la compréhension et la détermination des différents mécanismes qui sont en jeu. Ainsi que les conditions trophiques et édaphiques favorables à l'établissement des rhizobactéries. L'étude des capacités de colonisation rhizosphérique et de résistance aux différents facteurs de l'environnement s'avère une étape indispensable pour la réussite de l'utilisation de ces rhizobactéries.

Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives parmi lesquelles :

- L'étude des conditions favorables à la colonisation des PGPR avec les cultures fourragère.
- Tester et exploiter ces bactéries dans les traitements biologiques (*in vitro et in vivo*).
- Étudier les mécanismes d'action directs et indirects des PGPR
- Utilisée ces bactéries dans le bio contrôle des maladies phytopathogène affectant les cultures fourragère pour assurer la qualité de l'alimentation du bétail.

Références bibliographiques

- Abdel-Salam M.S., Abd El-Halim M.M. and El-Hamshary O.I.M., (2007).** Improvement of *Pseudomonas* antagonism against *Fusarium Oxysporium* through protoplast fusion : I fusants induction. *Research Journal of Cell and Molecular Biology*, 1, (1), pp 37-41.
- Aboul-Soud MA M., Yun B-W., Harrier L A. and Loake G.J., (2003).** Transformation of *Fusarium oxysporum* by particle bombardment and characterisation of the resulting transformants expressing a GFP transgene. *Mycopathologia*, 00, pp 1-8.
- Appel O. and Wollenweber H.W., (1910).** Die Kultur als Grundlage zur besseren Unterscheidung systematisch schwieriger Hyphomyceten. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, 28: 435-448.
- Arkhipova T.N., Veselov S.U., Melantiev A.I., Marty N.E.V. and Kudoyerova G.R., (2005).** Ability of bacterium *Bacillus* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil*, 272, pp 201-209.
- Armstrong G.M. and Armstrong J.K., (1981).** Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In "*Fusarium : Disease, Biology and Taxonomy.*" (Nelson P.E., T.A. & Cook R.J., eds.), pp. 391-399. Pennsylvania State University Press, University Park.
- Arora NK, Tewari S. and Singh R., (2013).** Multifaceted Plant-Associated Microbes and Their Mechanisms Diminish the Concept of Direct and Indirect PGPRS. In : Arora NK (ed.) *Plant Microbe Symbiosis : Fundamentals and Advances.* Springer, 411-449.
- Asha B.B, Chandra N. S, Udaya S.A.C, Srinivas C. and Niranjana S.R., (2011).** Biological control of *F. Oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* causing wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens*. Bangalore University, Bangalore, karnataka. 79-84 p.
- Aslantas R., Cakmakci R. and Sahin F., (2007).** Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apples trees growth and fruit yield under orchard conditions. *SCI HORT.*, 111 (4), pp 371-377.
- Audenaert, K., Pattery, T., Cornélis, P. and Höfte, M., (2002).** Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 : Role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15(11) :1147-1156.
- Aziz N.H., El-Fouly M.Z., El-Eassawy A.A. and Khalaf M.A., (1997).** *Bot Bul Acad Sini.* 38:33-9.
- Babalola, O.O., (2010).** Ethylene quantification in three rhizobacterial isolates from *Striga hermonthica*-infested maize and sorghum. *The Egyptian Journal of Biology* 12, 1-5.
- Barraquio W.L., Segubre EM, Gonzalez M A S, Verma S, James EK, Ladha J.K. and Tripathi AK., (2000).** Diazotrophic enterobacteria : what is their role in the rhizosphere of rice ; in *The quest for nitrogen fixation in rice* (eds) J K Ladha and PM Reddy (Los Banos : IRRI) pp 93-118.
- Baset M.M.A., Shamsuddin Z.H., Wahab Z. and Marziah M., (2010).** Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth and nitrogen incorporation of tissue-cultured *Musa* plantlets under nitrogen-free hydroponics condition. *Australian Journal of Crop Science*, 4 (2), 85-90.

- Beauchamp C.J., (1993).** Mode of action of plant growth-promoting rhizobacteria and their potential use as biological control agent. *Phytoprotection* 74:19-28.
- Beckman C.H., (1987).** The Nature of Wilt Diseases of Plants. (St. Paul, MN : American Phytopathological Society Press).
- Beckman C.H. and Roberts E.M., (1995).** On the nature genetic basis for resistance tolerance of fungal wilt diseases. *Advances in Botanical Research*, 21: 35-77.
- Bekkar A.A., (2016).** Pouvoir antagoniste et mode d'action de *Trichoderma* vis-à-vis de quelques champignons phytopathogènes thèse de doctorat en phytopathologie. p23. 176 p.
- Belabid L., (2003).** La fusariose vasculaire de la lentille (*Lens culinaris* Med.) dans le Nord Ouest Algérien Morphologie et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Emend. S. & H. f. sp. *Lentis* (Vasud. & Srin.) En relation avec la répartition géographique et le pouvoir pathogène. Thèse de Doctorat, Université d'Oran.
- Benchabane, M., (2005).** Caractérisation des effets d'antagonisme microbienne et de promotion de la croissance végétale de souche de *Pseudomonas* spp. Fluorescents, Thèse de Doctorat d'Etat, FSB-UTHB, Alger, 235p.
- Bernard TIVOLI (1988).** Guide d'identification des différentes espèces ou variétés de *Fusarium* rencontrées en France sur la pomme de terre et dans son environnement, F 35650
- Berrocal-Lobo M. and Molina A., (2007).** Arabidopsis defense response against *Fusarium oxysporum*. *Trends in Plant Science*, 13, (3), pp145-150.
- Besri, A., (1977).** La phase seminale du *Fusarium oxysporum* F.sp. *lycopersici*. Travaux dédiés à G. viennot-Bougin, 19-25.
- Bhattacharyya PN. And Jha DK., (2012).** Plant growth-promoting Rhizobacteria (PGPR) : emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 28: 1327-1350.
- Bholay A. D., Jadhav Priyanka. U., Borkhataria B. V. and Mayuri V. Dhalkari., (2012).** Fluorescent *Pseudomonads* as Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Their Siderophoregenesis. K.T.H.M. College, Nashik, M.S, India.6 p.
- Blancard D., (1988).** Maladie de la tomate. INRA Paris, PHM Limoges, 212 p.
- Blancard D., Laterrot H., Marchoux G. and Candresse T., (2009).** Les maladies de la tomate : Identifier, connaître, maîtriser. Editions Quae, Paris, 690 p.
- Blancard, D., (2013).** *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*. Institut national de la recherche agronomique.
- Beauchamp, C. (1993).** Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique. *Phytoprotection*, 74(1), 19–27.
- Bourion.V. (2016).** Recherche de déterminants génétiques et moléculaires impliqués dans l'architecture racinaire et nodulaire des légumineuses et contribuant à une amélioration de la nutrition azotée ; tel-01680215.
- Benhamou, N. & Picard, K. (1999).** La résistance induite : une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. *Phytoprotection*, 80(3), 137–168

- Bloemberg G.V. and Lugtenberg B.J.J., (2001).** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4, pp 343-350.
- Bolton A.T., (1984).** Root rot of *Ficus benjamina*. *Plant Dis*, 68: 816-817.
- Bonkowski, M., Geoghegan, I.E., Birch, A.N.E. and Griffiths, B.S., (2001).** Effects of soil decomposer invertebrates (protozoa and earthworms) on an above-ground phytophagous insect (cereal aphid), mediated through changes in the host plant. *Oikos* 95, 441-450.
- Booth C., (1971).** The genus *Fusarium*. Common wealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 237p
- Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. and Gardan, L., (2000).** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* : current status and need for revision. *Agronomie*. 20, 51-63.
- Botelho, G.R. and Mendonça-Hagler, L.C., (2006).** Fluorescent Pseudomonads associated with the rhizosphere of crops-An overview. *Brazilian journal of microbiology* 37, 401-416.
- Boukerma L, Benchabane M, Charif A and Khélifi L., (2017).** Activity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRS) in the Biocontrol of Tomato Fusarium Wilt. Saad Dahleb University, Algeria. 17 p.
- Boukerma L., (2012).** Effet des PGPR (*Pseudomonas* spp. fluorescents) sur le biocontrôle et l'induction de la résistance systémique (IRS) chez la tomate vis-à-vis de la fusariose vasculaire. [Thèse de Magister.] Saad Dahleb University, Algeria.
- Bounoua, M.D.J., (2011).** Essais d'utilisation des *Pseudomonas* spp et *Bacillus* spp dans le biocontrôle de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* sur tomate et *Verticillium dahlia* sur l'olivier. Mémoire de magister en biotechnologie.p2.
- Birch, L. and Bachofen, R., (1990).** Complexing agents from microorganisms. *Experientia* 46, 827-834.
- Bulit J., Louvet J., Bouhot D. and Toutain G., (1967).** Recherches sur les fusarioses. I. Travaux sur le bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier en Afrique du Nord. *Ann Epiphyties*, 18, 231-239.
- Cadet, J., Berger M., Morin B., Raoul S. and Wagner J. R... (1995).** Oxydative damage to DNA. *Deutsche Bibliothek Cataloging-in-Publication Data*, Germany.
- Cadet, J., Douki T., Gasparutto D. and Ravanat J.-L., (2003).** Oxidative damage to DNA : formation, measurement and biochemical features. *Mut. Res.* 531, 5-23.
- Cal A.D.E, Pascual S., Larena I. and Melgarejo P., (1995).** Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Plant Pathology*, 44 (5), pp 909-917.
- Cattelan, A.J., Hartel, P.G. and Fuhrmann, J.J., (1999).** Screening for plant growth promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of America Journal* 63, 1670-1680.
- Cannesan.M., Lecomte.C., Edel-Hermann.V., Langlois.A., Alabouvette.C., Fabien.R., Steinberg.C. (2018).** Outil de détection de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cyclaminis* et biocontrôle de la Fusariose du cyclamen ; hal-01839191

- Charan, A. R., V. P. Reddy, P. N. Reddy, S. S. Reddy and S. Sivaramakrishnan. (2011).** Assessment of genetic diversity in *Pseudomonas fluorescens* using PCR-based. *Methods. Biorem. Biodiv. Bioav.* 5, 10-16.
- Cheng, W., Coleman, D.C., Caroll, C.R. and Hoffman, C.A., (1994).** Investigating short term carbon flows in the rhizospheres of different plant species, using isotopic trapping. *Agronomy Journal* 86, 782-788.
- Cho ST, Chang HH, Egamberdieva D, Kamilova F, Lugtenberg B. and Kuo CH.. (2016).** Genome Analysis of *Pseudomonas fluorescens* PCL1751 : A Rhizobacterium that Controls Root Diseases and Alleviates Salt Stress for Its Plant Host, *PLOS One* .10 pages.
- Cranshaw W., (1998).** *Pests of the West : Prevention and Control for Today's Garden and Small.* Copyright (2), Canada, 248 p.
- Chin-A-Woeng T.F.C., Bloemberg G.V., Mulders I.H.M., Dekkers L.C. and Ben J.J., (2000).** Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 13: 1340-1345.
- Comporata., (1985).** « Antagonisme in vitro de *Trichoderma* spp vis à vis de *Rhizoctinia solani*, pp. 613-620, INRA Paris (FR).
- Corbaz, R., (1990).** *Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes.* Edition Presse polytechnique et universitaire romande. 286 p.
- Cornelis P., (2008).** The core and accessory regulons of *Pseudomonas*-specific extracytoplasmic sigma factors. *Molecular Microbiology*, 68(4), pp 810-812.
- Cornelissen B.J.C. and Melchers, L.S., (1993).** Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. *Plant Physiol.*, 101, pp.709-712.
- Couillerot O., Prigent-Combaret C., Caballero-Mellado J. and Moënne-Loccoz Y., (2009).** *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens *Letters in Applied Microbiology*, 48, (5), pp 505-512.
- Coulibaly, L., A. A. Yao, G. Lognay and M. L. Fauconnier., (2009).** Survival of freeze dried of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* related to their cellular fatty acids composition during storage. *Biotechnol.* 157, 70-84.
- Dasgupta R., Sapkota R., Bisht B. P. and Rawat D. S., (2012).** Assessment of the role of *Pseudomonas Fluorescens* as biocontrol agent against fungal plant pathogens. *International Research Journal of Pharmacy* ISSN 22308407. Baba Farid Institute of Technology, Dehradun, India. 178-180 p.
- Damage : Detec. Strat. EXCLI J. 7, 44-62. Larkin R.P. and Fravel D.R., (1998).** Efficacy of Various Fungal and Bacterial Biocontrol Organisms for Control of Fusarium Wilt of Tomato. *Plant Disease*, 82 (9), pp 1022-1028.
- De Ley J., and De Vos P., (1984).** *Biological and clinical : The genus Pseudomonas.* *Antonie van Leeuwenhoek*, 50, pp 281-303.
- Derylo M. and Skorupska A., (1993).** Enhancement of symbiotic nitrogen fixation by vitamin-secreting fluorescent *Pseudomonas*. *Plant and Soil*, 154, pp 211-217.

- Diby P., Sarma Y.R., Srinivasan V. and Anandaraj M., (2005).** Pseudomonas fluorescens mediated vigour in Black pepper (*Piper nigrum* L.) under green house cultivation. *Annals of Microbiology*, 55, (3), pp 171-174.
- Diener A.C. and Ausubel F.M., (2005).** Resistance to *Fusarium oxysporum* a dominant Arabidopsis disease-resistance gene is not race-specific. *Genetics*, 171: 305-321.
- Dmitri, V., Mavrodi, W. B., Linda, S. and Thomashow., (2006).** Phenazine Compounds in Fluorescent *Pseudomonas* Spp. Biosynthesis and Regulation, *Phytopathology* Vol.44, 417 445 p.
- Duc.G., Mignolet.C., Carrouée.B., Huyghe.C. (2010).** Importance économique passée et présente des légumineuses : Rôle historique dans les assolements et facteurs d'évolution ; hal-02658338
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. and Okon, Y., (2003).** Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 22(2) :107-149.
- Digat, B., (1994).** Les bactéries stimulatrices de la croissance des plantes : le cas des *Pseudomonas*. *C.R.Acad. Agric. fr.* 80 : 125-140.
- Dowling, D. N. and O'Gara, F., (1994).** Metabolite of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotech.* 12, 133-140.
- Edel V., Steinberg C., Avelange I., Laguerre G and Alabouvette C., (1995).** Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology*, 85 : pp.579-585.
- Elad Y., Chet I. and Katan J. (1980).** *Journal of Phytopathology*, 70: 119-121.
- Elias K.S. and Schneider R.W., (1991).** Vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Phytopathology*, 81, (2), pp 159-162.
- Experientia 21, 241-304. Reyes, M.E.Q., Rohrbach, K.G. and Paull, R.E., (2004).** Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 33(2) :193-203.
- EL AMRAOUIB., ELAMRAOUI.M., COHEN.N., FASSOUANE.A. (2013).** Biocontrôle de la fusariose vasculaire du melon par des microorganismes marins ; 15-25
- Erskine, W. and Bayaa, B., (1996).** Yield loss, incidence and inoculum density associated with vascular wilt of lentil. *Phytopathol. Mediterr.* 35, pp.24-32.
- Esitken, A., Karlidag, H., Ercisli, S. and Sahin, F., (2002).** Effects of foliar application of *Bacillus subtilis* Osu 142 on the yield, growth and control of shot-hole disease (*Coryneum* blight) of apricot. *Gartenbauwissenschaft.* 67(4) :139–142.
- Fiely M.B., Correll J.C. and Morelock T.E., (1995).** Vegetative compatibility, pathogenicity, and virulence diversity of *Fusarium oxysporum* recovered from spinach. *Plant Disease*, 79: 990-993.
- Fleurat-Lessard.F. (2010).** La protection des graines de légumineuses dans le cadre d'une agriculture durable en Afrique.
- Fayaud.B. (2012).** Déterminants de la croissance précoce et impact sur les interactions entre espèces dans les associations de cultures à base de légumineuses ; tel-00997180.

- Figueroa L.A.M, Cordero R.J.D., Martinez A.J.C., Meyer M.L., Lizarraga-S.G.D., Gastelum R.F., Castro-M.C. and Maldonado-M.I.E., (2016).** Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*, Springer Plus journal, 12 p.
- Fravel D., Olivain C., and Alabouvette C., (2003).** *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*, 157, pp 493-502.
- Gao, G., Yin D., Chen Y., Xia F., Yang J., Li Q. and Wang W..., (2012).** Effect of Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* 2P24 on Soil Fungal Community in Cucumber Rhizosphere Using T-RFLP and DGGE. *Soil Fungal Com. Cucum. Rhizos.* 7, 1-9.
- Gerhardson B., (2002).** Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnol*, 20: 338-343.
- Garampalli R. and Kumar H., (2015).** In vitro antifungal activity of some plant extracts against *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici*. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5: 22-27.
- Glick, B.R., (1995).** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41, 109-117.
- Gray, E. J., and Smith, D.L., (2005).** Intracellular and extracellular PGPR : commonalities and distinctions
- Gupta G, Parihar SS, Ahirwar NK, Snehi SK. And Singh V (2015).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) : Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *J Microb Biochem Technol* 7: 096-102.
- Hamdan H.D., Weller M. and Thomashow L.S., (1991).** *Applied Environmental Microbiology*, 57: 3270-3277.
- Hameed A. T. and Farhan H.N., (2007).** Effect of *Pseudomonas aureofaciens* and *Pseudomonas putida* on growth of sorghum biocolorand protect them from infection of *Rhizoctonia solani* fungi. *Al-Anbar University Journal for Pure Science*. 1(3), pp 8-16.
- Hernández-Salmerón JE, Hernández-León R, Orozco-Mosqueda Mdel C, Valencia Cantero E, Moreno-Hagelsieb G. and Santoyo G., (2016).** Draft Genome Sequence of the Biocontrol and Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* strain UM270, *Stand Genomic Sci*, 13 pages.
- Hirsch, A.M., Bauer, W.D., Bird, D.M., Cullimore, J., Tyler, B. and Yoder, J., (2003).** Molecular signals and receptors: Controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecology* 84, 858-868.
- Huang C.C. and Lindhout P., (1997).** Screening for resistance in wild *Lycopersicon* species to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersicirace* I and race 2. *Euphytica*, 93: 145-153.
- Hussain S., Ghaffar A. and Aslam M. (1990).** *Journal of Phytopathology*, 130: 157-160.
- Iqbal MA, Khalid M, Shahzad SM, Ahmad M. and Soleman N., (2012).** Integrated use of *Rhizobium leguminosarum*, plant growth promoting rhizobacteria and enriched compost for improving growth, nodulation and yield of lentil (*Lensculinaris* Medik). *Chilean J Agric Res* 72: 104-110.
- Jacques P., Delfosse P., Ongena M., Lepoivre P., Cornélis P., Koedam N., Neirinckx L. and Thonart P., (1993).** Les mécanismes biochimiques développés par les *Pseudomonas* fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol. *Cahier Agriculture, revue* 2, pp 301-307.

- Jeun Y.C., Park K.S., Kim C.H., Fowler W.D. and Kleopfer J.W., (2004).** Biological Control, 29: 34-42.
- Jonhson J. and Palleroni N.J., (1989).** Desoxyribonucleic acid similarities among Pseudomonas species. Int. J. Syst. Bacteriol, 39, pp 230-235.
- Jourdan E., Ongena M. and Thonart P., (2008).** Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes, Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 12, (4), pp 437-449.
- Kamilova F., Lamers G. and Lugtenberg B., (2008).** Biocontrol strain Pseudomonas fluorescens WCS365 inhibits germination of Fusarium oxysporum spores in tomato root exudate as well as subsequent formation of new spores. Environmental Microbiology, 10, (9). pp 2455-2461.
- Kamilova, F., Validov, S., Azarova, T., Mulders, I. and Lugtenberg, B., (2005).** Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. Environ. Microbiol. 7, 1809-1817.
- Kavanagh K., (2005).** Fungi: Biology and applications. John Wiley and Sons, England, 267p.
- Kawahara, H., (2008).** Cryoprotectants and Ice-Binding Proteins. In: R. Margesin, F. Schinner, J. C. Marx and C. Gerday eds. Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology. pp. 229-243. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Kerr, A., (1972).** Biological control of crown gall: seed inoculation. J Appl Bacteriol 35, 493-497.
- Khakipour N., Khavazi K., Mojallali H., Pazira and E. and Asadirahmani H., (2008).** Production of auxin hormone by fluorescent pseudomonads. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 4, (6), pp 687-692.
- Kammoun GL, Gargouri S, Hajlaoui MR, Marrakchi M. (2009).** Occurrence and distribution of Microdochium and Fusarium species isolated from durum wheat in northern Tunisia and detection of mycotoxins in naturally infested grain. Journal of Phytopathology, 157: 546-551.
- Khan, A.G., (2005).** Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. J. Elem Med boil. 18, 355-364. King E.O.,
- Latour X. and Lemanceau P., (1997).** Métabolisme carboné et énergétique des Pseudomonas spp. Fluorescents saprophytes à oxydase positive. Agronomie, 17, pp 427-423.
- Lee H., Damsz B., Woloshuk C.P., Bressan R.A. and Narasimhan ML., (2010).** Use of the plant defense protein osmotin to identify Fusarium oxysporum genes that control cell wall properties. Eukaryot Cell., 9 (4), pp 558-68.
- Leeman M., Van Pelt J.A., Hendrickx M.J., Scheffer R.J., Bakker, P.A.H.M., and Schippers B., (1995).** Biocontrol of Fusarium wilt of radish in commercial greenhouse trials : by seed treatment with Pseudomonas fluorescens WCS374. Phytopathology 85, 1301-1305.
- Lefrère J.J., and Rouger P., (2000).** Transfusion sanguine : Une approche sécuritaire. John Libbey Eurotext, France. Pp 175-177.
- Lecomte.C. (2016).** Fusariose du cyclamen : détection préventive du risque et contrôle biologique ; tel-01377645

Lemanceau, P., (1992). Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescent. *Agronomie. Revue* 12,413-437. Leong J., (1986). Siderophores : their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 24, 187-208.

Lepoivre P., (2003). Phytopathologie : Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. I ere édition, Editions De Boeck Université, Bruxelles, Gembloux, 432 p.

Leslie J.F. and Summerell B.A., (2006). The Fusarium Laboratory Manual ; Blackwell Publishing : Oxford, UK. Ltd, Iowa.p. 109.

Leslie, S. B., E. Israeli, B. Lighthart, J. H. Crowe and L. M. Crowe., (1995). Trehalose and Sucrose Protect Both Membranes and Proteins in Intact Bacteria during Drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.

Liu J., Gilardi G., Sanna M., Gullino M. L. and Garibaldi A., (2010). Biocontrol of Fusarium crown and root rot of tomato and growth-promoting effect of bacteria isolated from recycled substrates of soilless crops. *Phytopathol. Mediterr.* 49, AgriInnova, Torino, Italy. 163-171 p.

Llorens A., Hinojo M.J, Mateo R., Gonzalez-Jacén M., Valle-Algarra F.M., Logrieco A. and Jiménez M., (2006). Characterization of Fusarium spp isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). *Int J Food Microbiol*, 106(3) : 297-306.

Louis, P., Trüper H. G. and Galinski E. A., (1994). Survival of *Escherichia coli* during and storage in the presence of compatible solutes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 684 688.

Lugtenberg B. and Kamilova F., (2009). Plant-Growth-Promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, pp 541-556.

M'piga P., Belanger R. R., Paulitz T. C. and Benhamou N., (1997). Increased resistance to Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 0 63-28 Physiological and molecular plant pathology, 50,(5), Pages 301-320.

Marasas, W.F.O., Nelson, P.E and Toussoun, T.A., (1984). Toxinogenic Fusarium species. Pennsylvania State University provs. University Park.254 pp.

Meena B., Radhajeyalaksmi R., Marimuthu T., Vidyasekaran P. and Velazhagan R., (2002), *Biocontrol Science Technology*, 12: 195-204.

Mes J.J., Weststeijn E.A., Herlaar F. and Lambalk J.M., (1999). Biological and molecular characterization of Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici divides race 1 isolates into separate virulence groups. *Phytopathology*, 89, 156-160.

Messiaen, C.M., Blancard, D., Rouxel, F. and Lafon R., (1991). Les maladies des plantes maraichères 3ème ed. INRA Paris Pp 37, 552p.

Meyer S. I. F., Everts K. L., Gardener B. Mespadden, Masler E. P, Abdelnabby H. ME, and Skantar A. M., (2016). Assessment of DAPG-producing *Pseudomonas fluorescens* for Management of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* on Watermelon, *Journal of Nematology*, Volume 48, No. 1, 11 pages.

Michelina, R., Massimo, G., Oscar, A., Bernard., Jurgen, K. and Philippe, N., (2011). Lutte biologique ; tomate. Food Quality and Safety 6TH Framework Programme, p 5.

Miguel A., Maroto J.V., San Bautista A., Baixauli C., Cebolla V., Pascual B., Lopez Galarza S. and Guardiola J.L., (2004). The grafting of triploid watermelon is an advantageous alternative to soil fumigation by methyl bromide for control of Fusarium wilt. *Sci. Hortic*, 103: 9-17.

Morgan, C. A., Herman N., White P. A. and Vesey G., (2006). Preservation of microorganisms by drying. *J. Microbiol. Met.* 66, 183-193. Mputu K J-N, Pierart C, Destain J, Noki Ph. and Thonart Ph., (2014): Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment. Belgique. Biotechno.* 14-25.

Mishra R.K, Prakash O., Alam M. and Ikshit A.D, (2010). Influence of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on the productivity of *Pelargonium graveolens* L. *Herit. Recent Research in Science and Technology*, 2, (5) pp 53-57.

Moore, E.R.B., Tindall, B.J., Martins Dos Santos, V.A.P., Pieper, D.H., Ramos, J.L., and N.J., (2006). *Nonmedical : Pseudomonas, Prokaryotes*, Springer, USA. p 646 703.

Nakkeeran S., Fernando W.G.D. and Siddiqui Z.A., (2005). Plant growth promotin rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. In Siddiqui Z.A. (ed) *PGPR : Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Dordrecht, The Netherlands 313 p.

Nanasombat, S. and N. Sriwong, (2007). Improving viability of freeze-dried lactic acid bacteria using lyoprotectants in combination with osmotic and cold adaptation. *Sci. Tech. J.* 7. 61-67.

Nasraoui B., (2000). Champignons mitosporés Dans : Introduction a la phytomycologie : morphologie, biologie et systématique appliquée aux champignons phytopathogènes. Tunis, Tunisie, Centre de publication universitaire. pp.155-183.

Nautlyal CS, Johri JK. And Singh HB., (2002). Survival of the rhizosphere-competent biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* NBRI2650 in the soil and phytosphere, *Can J Microbiol*.

Nelson P.E., Toussoun T.A. and Marasas W.F.O., (1983). *Fusarium species : An illustrated manual for identification*. The Pennsylvania State University Press, University Park, 193 pp.

Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Cook, R.J., (1981). *Fusarium : Disease, biology and taxonomy*. The Pennsylvania State University Press, 457p.

Nezarat S. and Gholami A. (2009). *Pakistani journal of Biological Sciences*, 12: 26-32.

Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M. and Thonart, PH., (2010), Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. Faculty of Agricultural Sciences. University of Burundi.

Olivain C. and Alabouvette C., (1999). Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* in comparison with a non- pathogenic strain. *New Phytol.*, 141, 497-510

Ongena M., Daayf F., Jacques P., Thonart P., Benhamou N., Paulitz T.C., Cornelis P., Koedam N. and Belanger R.R., (1999). Plant Pathology, 48: 66-76.

Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M. and Sahin, F., (2006). Effects of plantgrowth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organicallygrowing raspberry. Sci. Hortic. 111(1) :38-43.

Ozbay, N. and Newman, S.E., (2004). Fusarium crown and root rot of tomato and control methods, ISSN 1680-8193. Plant pathology journal 3(1) :9-18.

Palleroni N.J., (1983). The taxonomy of bacteria. BioScience, 33, pp 370-377.

Palleroni N.J., (1993). Pseudomonas classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek, 64 (3-4), pp 231-251.

Pelzer.E., Bedoussac.L., Corre – Hellou.G., Jeuffroy.M.H., Métivier.T., Naudin.C. (2014). Association de cultures annuelles combinant une légumineuse et une céréale : retours d'expériences d'agriculteurs et analyse ; hal-01173338

Palleroni, N.J., (1984). Gram negative aerobic rods and cocci : family Pseudomonadaceae, William and Wilknes.Baltimore, 141-168.

Park K.H., Lee C.Y. and Son H.J., (2009). Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. Lett Appl Microbiol, 49 (2), pp 222-228.

Parret A.H.A., and R. De Mot., (2002). Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of *Pseudomonas* and other #-proteobacteria. Trends Microbiol., 10, pp 107-112.

Patten C.L. and Glick B.R., (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. Appl. Environ. Microbiol. 68, 3795-3801.

Paulsen, I. T., Press, C. M., Ravel, J., Kobayashi, D. Y., Myers, G. S., Mavrodi, D. V., Deboy, R., (2005). Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Nat. Biotechnol. 23, 873-885.

Penrose D.M., Moffatt Barbara.A. And Glick Bernard.R., (2001). Determination of 1 aminocycopropane-1-carboxylic acid (ACC) to assess the effects of ACC deaminase containing bacteria on roots of canola seedlings. Canadian Journal of Microbiology, 47 (1), pp 77-80.

Perry, S. F., (1998). Freeze-Drying and Cryopreservation of Bacteria. Molecular Biotechnology 9, 59-64.

Persello-Cartieaux F., Nussaume L., and Robaglia C., (2003). Tales from the underground : Molecular plant-rhizobacteria interactions. Plant Cell Environ., 26. Pp 189-199

Piano, S., Neyrotti, V., Migheli, Q. and Gullino, M.L., (1997). Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. Postharvest Biol. Technol. 11(3) :131-140.

Picard, C., Di Cello, F., Ventura, M., Fani, R. and Guckert, A., (2000). Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. Applied and Environmental Microbiology 66,948-955.

Prasad R. D., Rangeshwaran R., Hegde S. V. and Anuroop C.P. (2002). Crop Protection, 21:293-297.

Prasad R.D. and Rangeshwaran R., (2000). Journal of Mycology and Plant Pathology, 30: 216-220.

Raaijmakers J.M., Leeman M., Van Oorschot M.M.P., Van der Sluis I., Schippers B. and Bakker P.A.H.M., (1995). Dose-response relationships in biological control of fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathol* 85, pp 1075-1081.

Raaijmakers, J.M., (2009). The rhizosphere : a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil* 321, 341-361.

Raju N. S., Niranjana S. R., Janardhana G.R., Prakash H. S., Shetty H. S. and Mathur S.B., (1999). Journal of Food Science and Agriculture, 79: 206-212. Rakotoarimanga N., Zananirina J., Ramamonjisoa D. and Ramanankierana H., (2014). Lutte biologique antifongique : actinomycetes du sol rhizosphérique antagonistes de *Fusarium* isolé du fruit de tomate (*Solanum lycopersicum* L., 1753) pourri. Afrique SCIENCE 10(3). Université d'Antananarivo, Antananarivo, Madagascar. 243-255 p. Ramaiah A.K.,

Ramamoorthy V., Raguchander T. and Samiyappan R., (2002). Induction of defense related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pfl and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Plant and soil*, 239 (1), pp 55-68

Ravel J. and Cornelis P., (2003). Genomics of pyoverdine mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends Microbiol*, 11, pp 195-200.

Ravindra N.P., Raman G., Narayanan K.B. and Sakthivel N., (2008). Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BMC Microbiology*, 8, 230, pp 1-14.

Rey, L., (1965). Un développement nouveau de la lyophilisation : La cryodessiccation des systbmes non aqueux.

Rifat H., Safdar A., Ummay A., Rabia K. and Iftikhar A., (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion. *Ann Microbiol.* 20 p. DOI 10.1007/s13213-010-0117 1.

Rodriguez H. and Fraga R., (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances.* 17: 319-339.

Rosas S.B., Andrés J.A., Rovera M. and Correa N.S., (2006). Phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia-legume symbiosis. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, (12), pp 3502-3505.

Rouxel, F., Alabouvette, C., and Louvet, J., (1979). Recherches sur la résistance des sols aux maladies. IV : mise en évidence du rôle des *Fusarium* autochtones dans la résistance d'un sol à la fusariose vasculaire du melon. *Ann. Phytopathol.* 70:412-417.

Raaijmakers, J.M., Vlami, M. and De souza, J.T., (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agent. *Antonie Van Leeuwenhoek, revue* 81 (1-4) ,537-547.

Rudrappa T., Biedrzycki M.L., Kunjeti S.G., Donofrio N.M., Czymmek K.J., Paré P.W. and Bais H.P., (2010). The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Communicative & Integrative Biology* 3, (2), 130-138.

Saikia R., Srivastava A.K., Singh K., Arora D.K. and Min-Woong L., (2005). Effect of iron availability on induction of systemic resistance to Fusarium wilt of chickpea by Pseudomonas spp. Mycobiology, 33, (1), pp 35-40.

Santivarangkna, C., Higl B. and Foerst P., (2008). Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. Food Microbiol. 25, 429-441.

S. Y., Sukenobe J., Imaizumi T. and Nakahara T... (2008). Survival of freeze dried bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. 54, 9-24

Schneider.A., Huyghe.C., coord. (2015). Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables ; 78026

Unimar Rvista (1997).A RAPID, EASY AND HIGH YIELD PROTOCOL FOR TOTAL GENOMIC DNA ISOLATION OF Colletotrichum gloeosporioides AND Fusarium oxysporum ,18603-970,

Ward M.K. and Raney D.E., (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J Lab Clin Med., 44, 301-307.

Bio-suppression de la fusariose du Maïs et réduction des mycotoxines DON par des bactéries antagonistes du genre *Bacillus*



L. GARGOURI-KAMMOUN^{1,2}, H. JMJI¹, B. ESMGAIR¹, R. HAILAOUTI MOHAMMED¹, N. SADDI-ZOUAOU¹

¹ESA Kef, Université de Jendouba, 7119, La Kef, Tunisie, TUNISIE; ²Université de Carthage, Rue 1848 Karou 2009, Hammam, Tunisie.

¹Laboratoire Microorganismes et Biotechnologies Actives, Faculté des Sciences de Tasi, Campus Universitaire, 2002 Tunisie.

*Corresponding author: lobekammoun1@gmail.com

Abstract-In Tunisia, Maize is mainly used for the food supply of the cattle in greenery and in silage. The intensification of this cultivation was further developed thanks to the use of hybrid seeds as well as the creation of new irrigated parameters. However, the development of certain fungi in Maize can affect the grains' quality by causing mycotoxins' contamination. The latter are toxic for humans and animals as well, especially in case of a high level of ingestion. Trichothecene is, in fact, a type of mycotoxin produced mainly by *Fusarium culmorum* and *F. pseudograminearum*, one of the main factors that lead to maize ear rot. Given that, to fight this disease is difficult and it should be essentially based on the use of fungicides and the conduct of different cultural practices. Therefore, a search for new alternative strategies based on the microbial antagonism can be explored. The objective of the present paper is to study the growth of bacterial inhibitor of the fungi's growth, the disease development, as well as the mycotoxins production. A collection of two high-leveled toxine producing strains of *Fusarium culmorum* and *F. pseudograminearum* were grown in co-cultivation with *Bacillus* species. In vitro bio-attempts have demonstrated that *Bacillus subtilis* has significantly reduced the radial growth of both strains of Fungus. The different in-vivo-attempts were then realized on maize cobs with parallel analysis of the quantification of the trichothecenes deoxynivalenol (DON) type in grain by the ELISA test. These results show the decrease and the deletion of the levels of DON in the grain under study basically due to the opposing bacteria when compared with the specimen.

Keywords:Maize, deoxynivalenol, *Fusarium*, *Bacillus* spp.

Résumé - En Tunisie, la culture du Maïs est destinée principalement à l'alimentation du bétail en verdure et en ensilage. L'intensification de cette culture a été ensuite développée suite à l'utilisation de semences hybrides et à la création de nouveaux paramètres irrigués. Cependant, le développement de certains champignons peut altérer la qualité sanitaire des grains de Maïs par leur contamination par les mycotoxines. Ces dernières peuvent être toxiques pour l'homme et les animaux lorsqu'elles atteignent un certain seuil d'ingestion. Parmi ces mycotoxines, figurent les trichothécènes produites principalement par *Fusarium culmorum* et *F. pseudograminearum* agents causales de la fusariose de l'épi. Étant donné que la lutte contre cette maladie est difficile et se base essentiellement sur l'emploi des fongicides et des pratiques culturales, la recherche d'autres alternatives de lutte basée sur l'antagonisme microbien peut être explorée. L'objectif du présent travail, est la recherche de bactéries antagonistes capables d'inhiber la croissance du pathogène, le développement de la maladie et la production de mycotoxines. Pour ce faire, une collection de *F. culmorum* et de *F. pseudograminearum* possédant un pouvoir toxigène élevé ont été mis en co-culture avec des bactéries du sol du genre *Bacillus*. À la lumière des bio-essais réalisés in vitro, des souches de *Bacillus subtilis* ont inhibé significativement la croissance radiale des deux champignons. Des essais in vivo ont été ensuite réalisés sur des épis de Maïs, complétés par une analyse et une quantification des trichothécènes de type déoxyvalénol (DON) dans les grains moyennant le test ELISA. Ces résultats montrent la diminution et la suppression de la production des DON dans grains traités par les bactéries antagonistes comparés au témoin inoculé par l'agent pathogène seul.

Mots clés: Maïs, deoxynivalenol, *Fusarium*, *Bacillus* spp.

microorganismes du laboratoire de microbiologie et biomolécules active LMBA de la Faculté des Sciences de Tunis. Les bactéries étudiées appartiennent au genre *Bacillus* à savoir : *Bacillus subtilis* 19, *Bacillus pumilus* M3-16, *Bacillus subtilis* K1-11, *Bacillus subtilis* M1-20, *Bacillus subtilis* SR146, *Bacillus licheniformis* 124 et *Virgibacillus martsomortui* K1-19.

2.2 Test d'antagonisme in vitro

La sélection des bactéries antagonistes a été réalisée en adoptant la méthode de l'antagonisme direct (co-culture sur milieu solide). Cette méthode consiste à étaler la bactérie sous forme d'une strie sur une boîte de Pétri contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) ou TSA (Tryptic Soja Agar) et de placer le champignon sous forme de disque à une distance de 3 cm de la strie. Après 5 jours d'incubation à 25°C, le pourcentage d'inhibition de développement du champignon a été calculé en se basant sur la formule de Whipp (1987). Ensuite, l'inhibition de développement a été évaluée selon une échelle proposée par Korsten (1995).

2.3 Effet de l'antagonisme sur le nombre et la germination des spores

Tout d'abord, pour tester l'effet de l'antagonisme bactérien sur le nombre des spores des deux espèces, un milieu PDB (Potato Dextrose Broth) a été inoculé par les deux espèces de *Fusarium* séparément. Après incubation pendant 5 jours à 25°C, 200µl du milieu inoculé ont été utilisés pour une deuxième inoculation d'un milieu PDA qui a été à son tour incubé durant 10 jours à 25°C. Par la suite les cultures fongiques ont été raclées et filtrées pour obtenir une suspension sporale dont la concentration a été ajustée à 10⁸ spores/ml. Sachant qu'au cours de ce test les colonies des bactéries antagonistes ont été cultivées sur le milieu TSB à 5% NaCl pendant 48h à 30°C. Ce test a été réalisé dans des tubes eppendorf stériles, 200 µl de la culture bactérienne ont été mélangés avec 200 µl de la suspension sporale additionnée d'1 µl d'eau stérile à 5% glucose et incubés pendant 24h à 21°C. Le tube témoin n'a pas été ensemencé. Le même mélange décrit précédemment a servi pour déterminer l'effet des bactéries antagonistes sur la germination des spores des deux espèces *F. culmorum* et *F. pseudograminearum*.

2.4 Détection des composés volatils susceptibles d'être sécrétés par les bactéries antagonistes

Pour détecter les composés volatils susceptibles d'être sécrétés par les bactéries antagonistes, le test suivant a été adopté: d'une part une boîte de Pétri contenant un milieu TSA a été ensemencée par la bactérie antagoniste et incubée pendant 24h à 30°C. D'autre part un disque de champignon a été placé au centre d'une boîte de Pétri contenant un milieu PDA. Les deux boîtes ont été scellées de telle façon à avoir la boîte contenant la bactérie placée en dessous, et incubées pendant 5 jours à 25°C. Un test témoin contenant le champignon seul a été aussi étudié. L'évaluation du degré d'inhibition par les composés volatils est déterminée par la mesure des diamètres du mycélium fongique sur les boîtes traitées et les boîtes témoins.

Au cours de cette étude, l'effet des composés volatils sur la biomasse fongique des deux espèces de *Fusarium* a été déterminé. En effet, du papier cellophane stérile a été placé sur toute la surface de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA, ensuite un disque fongique a été placé au centre de la boîte. L'ensemble décrit précédemment a été scellé à l'aide d'une boîte de milieu TSA sur laquelle la bactérie antagoniste âgée de 24h a été cultivée. Les deux ensembles sont incubés pendant 5 jours à 25°C. Pour le témoin, on incube les boîtes contenant uniquement le pathogène. L'évaluation de la capacité de la bactérie antagoniste à réduire la biomasse du champignon est déterminée de la façon suivante : le papier cellophane occupant la surface de la boîte est pesé seul (m₀). La biomasse fongique est pesée aussi bien pour les boîtes témoins que pour les boîtes traitées. Sachant que : m_{emms}-m₀ ; avec m : biomasse de l'échantillon, et m_x : masse du papier cellophane + biomasse fongique.

2.5 Effet des fractions extra et intracellulaire bactériennes sur la croissance mycélienne des espèces fongiques

Les mycéliums des espèces fongiques ont été récupérés et dispatchés dans des tubes eppendorf. Puis, la concentration des tubes a été ajustée par le tris-HCl afin d'homogénéiser les concentrations. Ensuite, 800 µl de mycélium additionné à 100 µl de fraction intra ou extra cellulaire ont été mis dans un tube eppendorf et incubés pendant 14h à 37°C. Enfin, l'effet des bactéries antagonistes sur la croissance

1. Introduction

De nombreuses plantes en champs, notamment les céréales et le maïs, sont sujettes à l'attaque par plusieurs moisissures toxigènes, les plus préjudiciables appartenant au genre *Fusarium*. Les espèces de *Fusarium* peuvent provoquer, le plus souvent, l'attaque de ces cultures par la fusariose. L'importance économique de la fusariose est attribuée aux pertes de rendements considérables (avortement des fleurs, diminution du nombre et du poids des grains) et à l'altération de la qualité des grains par les mycotoxines (Lert *et al.*, 2009). Différentes fusarioxines peuvent être produites sur les grains issus d'épis contaminés. Il s'agit essentiellement des trichothécènes, zéaralénone et fumonisine. Les trichothécènes sont constitués de deoxynivalenol (DON) et nivalenol (NIV) dont la toxicité n'est pas identique. Les NIV sont considérés comme plus toxiques à l'homme et aux animaux alors que les DON peuvent être en plus phytotoxiques (Bottalco, 1998). Au champ, de nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer les niveaux de contamination des grains en fusarioxines, notamment les facteurs climatiques, les pratiques culturales, le potentiel toxigène des souches, l'abondance et la dispersion de l'inoculum et la sensibilité variétale. Les trichothécènes suscitent une attention particulière car elles rendent les grains ataqués impropres à la consommation et sont potentiellement responsables de problèmes de santé publique. Ces mycotoxines sont produites principalement par les espèces *Fusarium graminearum*, *Fusarium pseudograminearum* et *Fusarium culmorum* (Desjardins, 2006). Les trichothécènes provoquent chez certains animaux, après leur ingestion, plusieurs affections incluant des troubles digestifs, une leucopénie, une anorexie, des lésions au niveau du rein et du foie (Grosjean, 2002 ; Cahagne, 1997). De ce fait, parvenir à maîtriser l'accumulation des trichothécènes dans les cultures tel que le maïs et ses produits dérivés relève d'un double enjeu de santé publique économique. De plus, il n'existe pas de méthodes de décontamination appropriées et efficaces contre la production au champ des fusarioxines en général, et des trichothécènes en particulier. Par conséquent, la prévention de la croissance des agents producteurs demeure l'une des stratégies les plus prometteuses. Les méthodes préventives couramment utilisées incluent l'utilisation des pesticides, des variétés résistantes de maïs (sélection conventionnelle ou plantes génétiquement modifiées) associées à des pratiques culturales adéquates de travail du sol adaptées. Des outils prévisionnels permettant d'évaluer le risque de présence mycotoxines, ont été aussi développés. Cependant, la contamination du maïs par *Fusarium* est fortement modulée par les facteurs abiotiques tels que le climat, et en cas de conditions climatiques favorables à l'installation des espèces de *Fusarium*, l'absence totale des trichothécènes dans le maïs ne peut être garantie. L'utilisation d'antagonistes biologiques pourrait constituer une stratégie de lutte innovante et efficace contre l'accumulation des mycotoxines dans les grains. La lutte biologique, précisément par utilisation de micro-organismes, est une alternative prometteuse aux pesticides de synthèse, par la spécificité et l'efficacité d'action des agents antagonistes. L'ubiquité naturelle de ces agents dans les écosystèmes, leur grande variété, leur dissémination facile et leur persistance dans l'environnement. Des travaux ont rapporté l'existence au sein de certains micro-organismes appartenant aux genres *Acetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Trichoderma* (Cavaglieri *et al.*, 2004a ; Cavaglieri *et al.*, 2005 ; Cavaglieri *et al.*, 2004b ; Palumbo *et al.*, 2007) isolés de l'environnement du maïs (racine et rhizosphère), des souches capables de contrôler la croissance de *Fusarium* et de réduire significativement l'accumulation des trichothécènes. Cependant, bien que présentant de fortes activités anti-*Fusarium*, certains de ces micro-organismes, en occurrence les *Bacillus* et les *Pseudomonas*, présentent une importante innocuité. Il serait alors judicieux de rechercher des antagonistes microbiens capables d'assurer sainement la bio-protection du maïs au sein des micro-organismes qui sont généralement tolérés par l'homme et les animaux. Les bactéries du genre *Bacillus* sont connues pour leur innocuité mais aussi pour leurs activités antifongiques, pourraient constituer des agents prometteurs. L'objectif de cette étude, est d'explorer la capacité de certaines souches de bactéries à du genre *Bacillus* à contrôler le développement de pathogènes potentiellement productrices de mycotoxines sur le maïs.

2. Matériels et méthodes

2.1 Microorganismes

Les deux espèces de *Fusarium*, productrices de trichothécènes de type DON, utilisées dans cette étude sont *Fusarium culmorum* et *F. pseudograminearum*. Ces deux champignons ont été isolés et identifiés au cours d'une étude prospective des espèces de *Fusarium* attaquant le blé en Tunisie (Kammoun *et al.*, 2009). De plus, la collection de bactéries utilisées dans ce travail fait partie de la collection des

mycélienne a été évalué par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de l'ordre de 500 nm. Sachant que les fractions extra et intracellulaires sont obtenues comme suit :

- Pour l'obtention de la fraction extracellulaire, la culture bactérienne est centrifugée pendant 15 min à 8000 tours par minute. Le surnageant est dispatché sur des tubes coniques et concentré avec 3 volumes d'acétone puis incubé pendant 4h à -20°C. Par la suite la solution est centrifugée pendant 45 min à 12000 rpm, le culot est récupéré et additionné à 200µl de tri-HCl, (0,1M, pH8).
- Pour avoir la fraction intracellulaire, le culot est lavé avec une solution de NaCl (Me1%) puis le culot est mélangé avec 800µl de TEP pH7.5, 25 mM. Par la suite, le culot subi une sonication, suivie d'une centrifugation pendant 30 min à 12000 rpm, ce qui aboutit à un surnageant qui constitue la fraction intracellulaire.

2.6 Etude de l'antagonisme par la méthode de diffusion par puits

À l'aide d'un embout stérile des puits dans le milieu gélosé ont été créés, ces puits ont été partiellement saturés par la gélose molle à 0,9%. Un disque d'agar de mycélium de champignon a été placé au centre de la boîte et les fractions cellulaires (extra ou intracellulaire) ont été ajoutées aux puits dans un état saturé par le TEP ou le Tris-HCl (témoin). Après 5 jours d'incubation, le diamètre de la croissance radiale du mycélium sur la boîte a été déterminé.

2.7 Test d'antagonisme in vivo sur des épis de maïs

Au cours de ce test, des épis de maïs ont été testés. Tout d'abord les épis ont été décontaminés par l'alcool, puis des sites d'inoculation ont été créés à l'aide d'un emporte pièce stérile. Les sites d'inoculation ont été créés de telle façon qu'ils ont la même surface sachant que le même nombre de site a été créé pour chaque épi. L'inoculation a été réalisée par des morceaux d'agar contenant les mycéliums des espèces de *Fusarium* développés après 10 jours d'incubation. Pour chaque traitement des épis de maïs ont été essayés et l'expérience a été répétée trois fois. Le taux d'infestation des épis de maïs a été déterminé par le comptage des grains de maïs infectés par rapport à la totalité des grains par épi. De plus, le pourcentage de la réduction de la fusariose des épis de maïs a été calculé en utilisant la formule suivante : R(%) = (A-B/A)*100 ; Avec : A est le diamètre de la lésion enregistré dans les épis non traités inoculés uniquement par le pathogène, et B le diamètre de la lésion dans les épis traités par l'antagoniste.

2.8 Dosage des mycotoxines dans des grains infestés

Ce test a porté particulièrement sur le dosage du deoxynivalenol (DON). Il s'agit de la trichothécène la plus fréquemment associée à la fusariose de l'épi en Tunisie. La production du DON par ces espèces dans des échantillons de grains de maïs infestés a été estimée au moyen d'un kit ELISA (enzyme-linked immunoassay). Généralement, cette méthode permet de visualiser une réaction antigène anticorps grâce à une réaction colorée produite sur un substrat, d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps. Avant l'analyse, des échantillons de 200 g de grains ont été broyés et divisés en sous-échantillon de 5 g. Ensuite, 25 ml, d'eau distillée stérile ont été ajoutés pour chaque sous-échantillon. Le mélange a été d'abord agité vigoureusement pendant 3 minutes, ensuite filtré sur papier filtre Whatman N°1. Cinq microlitres de chaque filtrat ont été utilisés pour le test ELISA. Les standards et les échantillons ont été analysés suivant les instructions du fournisseur RIDASCREEN® DON Kit (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany). Sachant que ce kit détermine les concentrations de DON, 3-AcDON, et 15-AcDON combinées. Ce test a été réalisé en plusieurs étapes. Au début, 50 µl de chaque solution étalon ou échantillon ont été ajoutés dans les puits correspondants. Puis, 50 µl du conjugué enzymatique et 50 µl de solution d'anticorps anti-deoxynivalenol ont été ajoutés. Le mélange a été ensuite agité doucement, en effectuant un mouvement circulaire de la plaque, et incubé pendant 30 mn à la température ambiante (20-25 °C). Pour retirer tout le liquide des puits, ces derniers ont été vidés en renversant la plaque de microcontrôle, sur du papier absorbant. Par la suite, les puits ont été remplis avec 250 µl de tampon, puis vidés de nouveau, et l'opération a été répétée deux fois. Les puits ont été remplis de nouveau par l'ajout de 100 µl d'une solution substrat/chromogène. Le mélange a été agité doucement et incubé à l'obscurité et à la température ambiante (20-25 °C) pendant 15 mn. Le test a été terminé par l'ajout de 100 µl, de solution stop dans chaque puit, en agitant doucement et en effectuant un mouvement circulaire sur la paillasse. Enfin, dans les 10 mn suivantes,

L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Multiskan Ascent® software (LabSystems, Helsinki, Finland) à une densité optique $\lambda=490$ nm.

2.9 Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 v.5.03. (2009) pour l'analyse de la variance en appliquant le test Anova traitement Dunnett (bilatéral). Toutes les analyses statistiques ont été faites pour un intervalle de confiance de 5 %.

3. Résultats et discussion

3.1 Test d'antagonisme in vitro

Les résultats du test d'antagonisme in vitro ont montré qu'en testant les deux milieux de culture PDA et TSA, une inhibition de la croissance fongique a été révélée. Cette inhibition est variable selon la souche bactérienne et l'isolat de *Fusarium* testé (Figure 1).

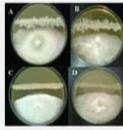


Figure 1: Test d'antagonisme direct in vitro : (A) sur milieu PDA : confrontation entre *F. culmorum* et la souche MI-20, (B) sur milieu PDA : confrontation entre *F. pseudograminearum* et la souche MI-20, (C) sur milieu TSA : confrontation *F. culmorum* et la souche SR-146, (D) sur milieu TSA : confrontation entre *F. pseudograminearum* et la souche SR-146.

Les résultats de ce test ont montré globalement que parmi les sept bactéries testées, quatre souches bactériennes ont révélé un pouvoir d'inhibition de croissance à savoir : J9, SR146, MI-20 et KI-11 avec des taux d'inhibition allant de 11.66 % à 58.33 % (Figure 2). Sur le milieu TSA, les meilleurs taux d'inhibition des isolats *F. culmorum* et *F. pseudograminearum* ont été marqués par la souche MI-20 avec des taux de l'ordre de 55% et 58% respectivement. Alors que sur le milieu PDA, les taux d'inhibitions de la croissance fongique les plus élevés ont été marqués par la bactérie J9.

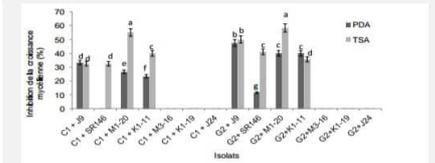


Figure 2: Effets des bactéries antagonistes sur la croissance mycélienne des deux espèces de *Fusarium* sur les milieux de culture PDA et TSA. Avec C1 : *F. culmorum*, G2 : *F. pseudograminearum*. Les moyennes suivies par différentes lettres sont significativement différentes ($p < 0.05$).

Ce test a montré aussi que le pouvoir d'inhibition ne dépend pas uniquement de la bactérie ou du pathogène mais également du milieu de culture. Sur le milieu de culture PDA la souche bactérienne SR-146 est sans effet sur la croissance mycélienne de *F. culmorum* mais elle a montré une faible inhibition de croissance vis-à-vis de *F. pseudograminearum* (11.66 %). Alors que sur le milieu TSA la souche SR-146 a manifesté un antagonisme envers *F. culmorum* de l'ordre de 35.5% et un pouvoir d'inhibition de croissance de *F. pseudograminearum* (40%) plus élevé que celui enregistré sur le milieu PDA. Ces résultats peuvent être expliqués du fait que les composants nutritionnels du milieu jouent un rôle important dans la production des métabolites antifongiques par les *Bacillus spp* (Hebbar et al., 1992). La différence dans l'effet inhibiteur de croissance du mycélium peut être due au milieu de croissance des deux protagonistes, ainsi le milieu du test peut influencer le degré de l'antibiose manifesté par les antagonistes en question (Cavaliere et al., 2005).

3. 2 Effet de l'antagoniste sur le nombre et la germination des spores

Les résultats de ce test ont montré que parmi les bactéries testées, les souches J9 et SR146 ont réduit considérablement le nombre de spores. D'ailleurs la souche SR146 a inhibé complètement la sporulation de *F. culmorum* (tableau 1). Les autres souches sont dotées aussi d'une activité antifongique variable à l'exception de la souche J24 qui a réduit légèrement le nombre de spores. La réduction de nombre de spores peut être en relation avec la quantité de substances antifongiques sécrétées par les bactéries antagonistes qui inhibent la division des spores et leur germination.

Tableau 1 : Effet des bactéries antagonistes sur le nombre de spores.

Traitement	Nombre de spores (x 10 ⁹)
Témoin C1	42
C1+J9	14
C1+SR-146	0
C1+MI-20	18
C1+KI-11	32
C1+MI-16	22
C1+KI-19	30
C1+J24	34
Témoin G2	18
G2+J9	4
G2+SR-146	6
G2+MI-20	6
G2+KI-11	10
G2+MI-16	6
G2+KI-19	8
G2+J24	12

Les observations microscopiques ont montré aussi l'efficacité des bactéries antagonistes sur la germination des spores des deux isolats de *Fusarium*. Au bout de 24 h et sans traitement bactérien les spores ont germé pour donner naissance aux hyphes mycéliens qui s'allongent et s'enchevêtrent (Figure 3, A).

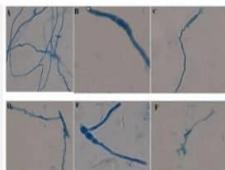


Figure 3: Observation microscopique montrant l'effet des bactéries antagonistes sur la germination des spores des deux espèces de *Fusarium* après 24h d'incubation à 23°C (X 40). (A) Témoin C1 ; (B) Spores de C1 additionnées d'une suspension bactérienne de J9 ; (C) Spores de C1 additionnées d'une suspension bactérienne de SR-146 ; (D) Témoin G2 ; (E) Spores de G2 additionnées d'une suspension bactérienne de J9 ; (F) Spores de G2 additionnées d'une suspension bactérienne de SR-146.

Cependant, les bactéries antagonistes notamment J9 et SR146 ont notablement entravé la germination des spores de C1 et G2 (Figure 3, B, C, E, F). L'observation microscopique a montré aussi qu'après 24h d'incubation dans l'eau glucosé à 5%, les spores de *F. culmorum* ont fortement germé alors que celles de *F. pseudograminearum* ont moyennement germé (Figure 3, A, D). Les spores jouent un rôle primordial dans l'incidence et la dissémination de la fusariose de l'épi de maïs (Desjardins et al., 2004). En effet, elles sont transportées jusqu'aux épis par le vent et les insectes, dans des conditions environnementales favorables les spores germent et induisent la maladie. Ainsi réduire le nombre de spores et/ou leurs germinations, c'est réduire la propagation de la maladie.

3.3 Effet des composés volatils sécrétés par les bactéries antagonistes

Le test d'antagonisme in vitro met en évidence le phénomène de l'antibiose. En effet les bactéries efficaces contre le champignon pathogène synthétisent des substances antifongiques qui diffusent dans le milieu et sont capables d'arrêter la croissance du mycélium. La caractérisation de ces substances antifongiques impose de savoir si ces dernières sont d'origine intracellulaire ou extracellulaire. L'essai de la culture des espèces de *Fusarium* en présence des fractions cellulaires montre l'aptitude des fractions intracellulaire et extracellulaire à diminuer le développement des champignons. D'ailleurs, les résultats de ce test ont montré que la fraction intracellulaire de MI-20 a réduit la croissance de *F. culmorum* de l'ordre de 70 % et celle de *F. pseudograminearum* de l'ordre de 42 % (Figure 5). De plus, les résultats ont montré que la fraction interne de KI-11 a réduit la croissance de *F. culmorum* de 45 % et de *F. pseudograminearum* de 41 % ainsi les biomolécules actives synthétisées par KI-11 sont intracellulaires (Figure 4).

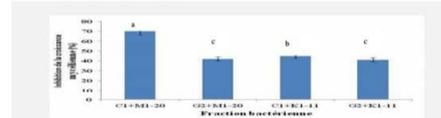


Figure 4 : Effet des fractions bactériennes intracellulaires sur la croissance mycélienne des isolats *F. culmorum* (C1) et *F. pseudograminearum* (G2). Les moyennes suivies par différentes lettres sont significativement différentes ($p < 0.05$).

La fraction extracellulaire de J9 a réduit la croissance de *F. culmorum* de 55 % et *F. pseudograminearum* de 52 % ainsi les biomolécules actives produites par J9 sont extracellulaires. La fraction extracellulaire de SR146 a réduit la croissance de *F. culmorum* de 45 % et *F. pseudograminearum* de 51 % ainsi les biomolécules actives synthétisées par SR146 sont extracellulaires (Figure 5).

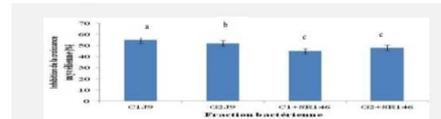


Figure 5 : Effet des fractions bactériennes extracellulaires sur la croissance mycélienne des isolats *F. culmorum* (C1) et *F. pseudograminearum* (G2). Les moyennes suivies par différentes lettres sont significativement différentes ($p < 0.05$).

Les résultats de ce test ont montré qu'à part, les substances antifongiques diffusibles, les *Bacillus spp* produisent également des substances volatiles capables d'inhiber la croissance de *Fusarium*. Ces résultats concordent avec plusieurs travaux montrant la capacité des espèces du genre *Bacillus* à produire des composés volatils antifongiques. L'étude de Pal et al (2000) montre que la souche MR-11(2) du genre *Bacillus* produit des antibiotiques, des composés volatils et des siderophores contre *Fusarium*. Les observations macroscopiques ont montré que les composés volatils ont causé des aberrations au niveau des structures mycéliennes de *Fusarium* : des lyses au niveau des hyphes, une vacuolisation ainsi qu'une granulation des structures mycéliennes et un gonflement anormal des conidies.

3.4 Test d'antagonisme in vivo sur des épis de maïs

Les bactéries qui ont manifesté une activité antifongique in vitro ont été utilisées pour des essais in vivo sur des épis de maïs. Les résultats de ce dernier test ont montré que les souches bactériennes sélectionnées ont permis la réduction de la propagation du mycélium du pathogène (Figure 6). En effet, la souche J9 a réduit la maladie de l'ordre de 64.22 % pour les épis inoculés par *F. culmorum* (C1) et de l'ordre de 68.57 % pour ceux inoculés par *F. pseudograminearum* (G2).

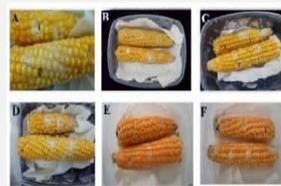


Figure 6 : Effet des bactéries antagonistes sur la fusariose d'épi de maïs in vivo : (A) épis inoculés par le champignon C1, (B) épis inoculés par C1 et la bactérie J9, (C) épis inoculés par C1 et la bactérie SR146, (D) épis inoculés par le champignon G2, (E) épis inoculés par G2 et la bactérie J9, (F) épis inoculés par G2 et la bactérie SR146.

L'espèce SR146 s'est avérée également efficace contre la maladie qui se trouve atténué de 60% quand les épis ont été inoculés par C1 et de 50% pour les épis inoculés par G2. Cependant l'espèce MI-20, hautement active in vitro, a réduit de 43 % et de 40 % la maladie quand les épis ont été inoculés respectivement par C1 et G2. De même la souche KI-11, a réduit moyennement la maladie (Figure 7). Sachant qu'au cours de cet essai, les résultats ont montré aussi qu'en appliquant le mélange des deux bactéries J9 et SR146 les pourcentages de la réduction de la maladie n'ont pas dépassé 55% et 20% pour les isolats C1 et G2 respectivement.

L'analyse statistique des résultats obtenus confirme l'effet réducteur exercé par les bactéries antagonistes sur l'intensité de la fusariose de l'épi de maïs. La réduction de la maladie a été hautement significative pour toutes les bactéries testées pour le cas de *F. culmorum*. Alors que pour la souche *F. pseudograminearum*, l'effet réducteur exercé par les bactéries antagonistes a été variable allant d'une réduction non significative à une réduction hautement significative.

Il est généralement connu que l'expression d'antagonisme des micro-organismes envers un pathogène dans un milieu de culture ne peut pas être évidemment garantie sous serre ou en plein champ. En effet, il a été démontré que la corrélation entre l'antibiose in vitro et le contrôle biologique in vivo est fréquemment incohérente (Reddy et al., 1993).

Bevins et al (1998) ont obtenu une faible corrélation entre les résultats obtenus in vitro et ceux observés sous serre quand ils ont voulu évaluer la capacité des *Bacillus subtilis* à réduire *F. moniliforme* et *F. proliferatum* dans le maïs. Cependant, la présente étude plaidé en faveur d'une importante corrélation entre l'antagonisme obtenu in vitro et la capacité de *B. subtilis* à inhiber la colonisation des grains de maïs par les espèces de *Fusarium*. L'étude menée par Cavaliere et al. (2005) a montré

l'efficacité de *B. subtilis* CE1 *in vitro* ainsi qu'*in vivo* dans la réduction de *F. verticilloides* et *F. graminearum* dans les grains de maïs. Les résultats des travaux de Palazzini et al (2007) concordent avec nos résultats, en effet les espèces de *Bacillus* sélectionnées ont réduit la sévérité de la fusariose des épis de maïs de plus de 71% sous serres mais ces bactéries n'ont pas réduit l'incidence de la maladie. Cette remarquable réduction de sévérité de la maladie est similaire à celle rapportée par Da Luz (2000) en utilisant *Bacillus megatherium* et *Bacillus subtilis*.

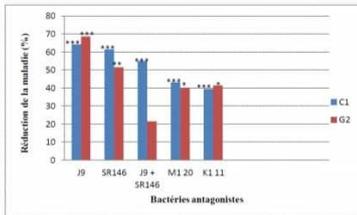


Figure 7 : Effet des bactéries antagonistes sur la fusariose de l'épi du maïs. (***) : Différence très hautement significative, (***) : différence hautement significative, (*) : différence significative, C1 : *Fusarium culmorum*, G2 : *Fusarium pseudograminearum*. (p < 0,05).

3.5 Dosage du déoxynivalénol (DON) dans des grains infestés

Ce test consiste à faire le dosage du déoxynivalénol (DON) dans les grains de maïs traités par *F. culmorum* et les bactéries antagonistes moyennant le test ELISA. L'objectif de ce test est de vérifier l'effet de ces bactéries sur la réduction de la contamination des grains de maïs par les mycotoxines particulièrement les DON. Les résultats ont montré que les teneurs en trichothécènes de type DON ont varié selon la bactérie antagoniste de 6,2 à 11,5 ppm. Des travaux ultérieurs réalisés par Khan et al (2004) ont montré que le contenu des grains de maïs a été rarement réduit par les traitements biologiques même si la sévérité de la maladie a été significativement réduite par les espèces : *Bacillus subtilis* AS433, *B. subtilis* AS434, *B. subtilis* OH131.1. Ces données s'opposent aux résultats trouvés au cours de cette étude qui ont montré que la bactérie *Bacillus subtilis* J9 a considérablement réduit le taux des DON dans les grains de maïs. De plus, les résultats trouvés sont en concordance avec ceux de Palazzini et al (2007) qui a montré que l'antagonisme exercé par la présence de bactéries spécifiques (*Bacillus* spp) peut influencer la production de mycotoxines. En fait, parmi 22 isolats testés 50% étaient capables de diminuer le taux de DON à des niveaux indétectables dans les grains de maïs irradiés. Plusieurs études s'orientent vers la nécessité de lutter contre la croissance des champignons pathogènes de genre *Fusarium* afin de réduire la contamination des aliments par les mycotoxines sécrétées par ce genre de champignons. Cette idée est contrariée par des études plus récentes qui ont mis en évidence le rôle des mycotoxines comme facteur de virulence qui favorise l'installation et la propagation du champignon pathogène. Maier et al (2006) met en évidence le rôle de DON dans la colonisation des épis de maïs. Les travaux de Mudge et al (2006) ont mis en évidence le rôle de DON dans la propagation de la pourriture de la couronne du blé causée par *Fusarium graminearum* et *Fusarium pseudograminearum* vers la tige et sa colonisation par ces espèces.

4. Conclusion

Fusarium est un champignon phytopathogène avec une distribution globale capable d'infecter une large gamme de plantes incluant les céréales comme le maïs, le blé et l'orge. La contamination des céréales par ce champignon pose un problème majeur pour les agriculteurs surtout que le rendement et la qualité du produit agricole peuvent être réduits. L'application des bactéries de genre *Bacillus* a inhibé la croissance des deux espèces de *Fusarium* : *Fusarium pseudograminearum* et *F. culmorum*. Les résultats du test de la double culture *in vitro* suggèrent que les métabolites antifongiques produits par ces bactéries sont à l'origine de l'inhibition de la croissance et la lyse des hyphes de *Fusarium*. Les bactéries antagonistes produisent aussi des composés volatils capables de réduire la croissance de *Fusarium*. Les bactéries antagonistes, des *B. subtilis* ont montré également une capacité à inhiber la germination des spores de *Fusarium* qui jouent un rôle primordial dans l'incidence de la fusariose de l'épi de maïs. Cette aptitude à réduire la croissance de champignon *in vitro* corrélée avec la capacité des bactéries antagonistes à réduire la maladie sur les épis de maïs. Le taux de DON dans les grains de maïs a été également significativement réduit quand les bactéries antagonistes sont appliquées. Ce travail a permis aussi d'explorer la capacité des bactéries du genre *Bacillus* en particulier les souches appartenant à l'espèce *B. subtilis* à prévenir la croissance des *Fusarium* spp producteurs de DON. Ainsi il est intéressant de caractériser les biomolécules qui sont à l'origine de l'inhibition de la croissance fongique. La détermination des conditions optimales de production et la purification de ces métabolites antifongiques semble également très intéressante.

5. Références

- Bevino A, Sarrocco S, Dalmastrici C, Tabacchioni S, Cantale C, Chiarini L. (1998). Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27: 225-237.
- Botfalco A. (1998). *Fusarium* disease of cereals: species complex and related mycotoxin profiles in Europe. *Journal of Plant Pathology* 80: 85-103.
- Cahagnier R. (1997). Les mycotoxines dans les céréales. Journée d'information « céréales et sécurité alimentaire », dossier participatif. IFBM, Nancy p19-25.
- Cavaglieri L, Passone A, Etcheverry M. (2004a). Screening procedures for selecting rhizobacteria with biocontrol effects upon *Fusarium* growth and fumonisin B-1 production. *Research in Microbiology* 15: 747-754.
- Cavaglieri L, Passone A, Etcheverry M G. (2004b). Correlation between screening procedures to select root endophytes for biological control of *Fusarium verticilloides* in *Zea mays* L. *Biological Control* 31: 259-267.
- Cavaglieri L, Orlando J, Rodriguez MI, Chulze S, Etcheverry M. (2005). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticilloides* *in vitro* and at the maize root level. *Research in Microbiology* 156: 748-754.
- Desjardins AE. (2006). *Fusarium* mycotoxins Chemistry, Genetics and Biology. *APS Press, St. Paul, MN*, p 260.
- Desjardins AE, Jarosz AM, Pfaffner RD, Alexander NJ, Brown DW, Jurgensen JE. (2004). Patterns of trichothecene production, genetic variability, and virulence to wheat of *Fusarium graminearum* from smallholder farms in Nepal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6341-6346.
- da Luz WC. (2000). Biocontrol of *Fusarium* head blight in Brazil. In: *Proceedings 2000 National Fusarium Head Blight Forum, 10-12 December 2000, Erlanger, KY, USA*, pp. 77-81.
- Grosjean F. (2002). Toxicité des mycotoxines des céréales. *Perspectives Agricoles n°278 avril 2002* p28-30.
- Hebbar P, Davey AG, Dart PJ. (1992). Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fusarium moniliforme*, a soil borne fungal pathogen: isolation and identification. *Soil Biol Biochem.* 24: 979-987.
- Hesseltine CW, Rogers RF, Showell O. (1978). Fungi especially *Gibberella zeae*, and zearalenone occurrence in wheat. *Mycologia* 70: 14-18.
- Kammoun GL, Gargouri S, Hajlaoui MR, Marrakchi M. (2009). Occurrence and distribution of *Microdochium* and *Fusarium* species isolated from durum wheat in northern Tunisia and detection of mycotoxins in naturally infested grain. *Journal of Phytopathology*, 157: 546-551.
- Khan NI, Schilder DA, Boehm MJ, Lipps PE, Slininger PJ. (2004). Field testing of antagonist of *Fusarium* Head Blight incited by *Gibberella zeae*. *Biol Control* 29: 245-253.
- Lori GA, Sisterna MN, Sarandon SJ, Rizzo L, Chidichimo H. (2009). *Fusarium* head blight in wheat: impact of tillage and other agronomic practices under natural infection. *Crop Protection* 28: 495-502.
- Maier FJ, Mirdaner T, Haderer B, Felk A, Salomon S, Lemmens M, Kassner H, Schafer W. (2006). Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the



20º Seminário de Iniciação Científica e 4º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental
 21 a 23 de setembro de 2016, Belém, PA.

BIOCONTROLE *in vitro* DE *Colletotrichum graminicola*, AGENTE ETIOLÓGICO DA ANTRACNOSE FOLIAR DO MILHO

Cássia Cristina Chaves Pinheiro¹, Ruth Linda Benchimol², Carina Melo da Silva³, Iêda Alana Leite de Sousa⁴, Francisco Ronaldo Sarmanho de Souza⁵, Eudes de Arruda Carvalho⁶

¹Bolsista CNPq Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, cassiapinheiro002@gmail.com
²Pesquisadora Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, ruth.benchimol@embrapa.br
³Bolsista de doutorado CAPES, Laboratório de Fitopatologia, carinamelosilva@gmail.com
⁴Estagiária Embrapa Amazônia Oriental, ialanaleite@gmail.com
⁵Pesquisador Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Melhoramento Genético, ronaldosarmanho@embrapa.br
⁶Pesquisador Embrapa Quarentena Vegetal, Laboratório de Fitopatologia, eudes.carvalho@embrapa.br

Resumo: A antracnose foliar do milho, causada por *Colletotrichum graminicola*, é uma das principais doenças que incidem na cultura, sendo responsável por perdas elevadas de produtividade. O controle biológico utilizando microrganismos vem se tornando uma alternativa atraente para diminuir ou eliminar o uso de agroquímicos, tornando os alimentos mais saudáveis e com menor custo de produção. Nesse trabalho, objetivou-se avaliar *in vitro* o efeito inibitório de rizobactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* contra *C. graminicola*, utilizando o método de pareamento de colônias. Discos de micélio do patógeno retirados da extremidade de colônias cultivadas em BDA foram colocados, individualmente, no centro de placas de Petri contendo meio de BDA, onde um círculo de crescimento bacteriano foi previamente traçado com bastão de vidro, acompanhando as bordas das mesmas. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com cinco tratamentos (quatro isolados e testemunha) e cinco repetições. Todos os isolados de rizobactérias demonstraram efeito antagonístico significativo sobre o crescimento micelial de *C. graminicola*, quando comparados com o tratamento testemunha.

Palavras-chave: Antagonismo, Controle biológico, Efeito inibitório

Introdução

A antracnose foliar do milho [*Zea mays* L.], causada por *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wilson, é uma das mais devastadoras doenças que ameaçam a produção dessa cultura no Brasil,



reduzir a produção de grãos e de forragem em 50% ou mais, dependendo da severidade da doença (CASELA et al., 1992; NIETSCHÉ et al., 2001).

A principal medida de manejo da doença é o plantio de cultivares geneticamente resistentes, mas, devido à alta variabilidade do patógeno e à sua alta capacidade de multiplicação, tem-se observado uma rápida adaptação desse organismo aos genes de resistência da planta hospedeira. Por conseguinte, o controle da doença tem sido feito com o uso de insumos químicos que, não raramente, resultam em altos custos ambientais e econômicos (COSTA et al., 2003).

O controle biológico por microrganismos apresenta-se como alternativa inteligente para a redução ou eliminação do uso de agroquímicos no controle de doenças fitopatogênicas e dentre os possíveis agentes para o biocontrole, destacam-se as rizobactérias, que são encontradas naturalmente em elevada diversidade no solo e que apresentam atividade antagonística contra outros componentes da comunidade microbiana (GHINI; NAKAMURA, 2001). O objetivo desse trabalho foi avaliar *in vitro* o efeito inibitório de rizobactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* contra *C. graminicola* visando subsidiar futuros programas de manejo da antracnose foliar do milho.

Material e Métodos

O isolado de *C. graminicola* foi obtido de folhas de milho cultivado em sistema de plantio direto no município de Paragominas, PA, e os isolados de rizobactérias foram obtidos de amostras de solo da Empresa Socóco Produtos Alimentícios S/A, ambos depositados na coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental. As rizobactérias dos gêneros *Bacillus* (B23 e B14), e *Pseudomonas* (P22, P23 e P41), foram selecionadas para os testes, por terem apresentado melhor desempenho em testes preliminares de antagonismo *in vitro* contra outros fitopatógenos.

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental, pelo método de pareamento de colônias. Para tal, o patógeno foi cultivado em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) por sete dias e as rizobactérias, pré-selecionadas em testes preliminares, foram reativadas em meio de cultura NA (Nutriente-Ágar) por 48 horas. Em seguida, discos de micélio do



previamente traçado acompanhando a borda das mesmas, com auxílio de um bastão de vidro. Foram utilizadas como testemunhas placas contendo apenas um disco de micélio do patógeno, na ausência das rizobactérias. As placas foram mantidas em incubadora do tipo BOD, à temperatura de 28 ± 2 °C e fotoperíodo de 12h claro/escuro, por sete dias. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com cinco tratamentos, constituídos de cinco rizobactérias (B23, B14, P22, P23 e P41) e testemunha, e cinco repetições. As avaliações foram feitas diariamente, a partir de 24 horas da montagem do ensaio, medindo-se o crescimento radial (mm) das colônias do patógeno, até este completar seu crescimento no tratamento testemunha. Os dados obtidos com essa avaliação foram empregados no cálculo do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM). A análise estatística de variância foi feita pelo teste F (p-valor<0.05) e as médias de crescimento foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (p-valor<0.05). O programa utilizado para as análises foi o SISVAR, versão 5.6.

Resultados e Discussão

Observou-se que todos os isolados de rizobactérias testados demonstraram efeito antagonístico significativo sobre o crescimento micelial de *C. graminicola*, quando comparados com a testemunha (Figura 1).

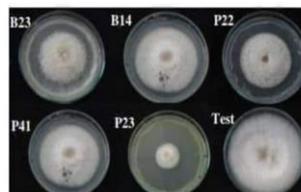


Figura 1- Crescimento micelial de *Colletotrichum graminicola* na presença de rizobactérias (Fonte C.C.C.Pinheiro).

O crescimento micelial do patógeno foi de 18,98 mm, 29,65 mm, 30,43 mm, 34,17 mm e 34,32 mm na presença dos isolados P23, P41, P22, B23 e B14, respectivamente, enquanto que no tratamento testemunha o crescimento deste foi de 41,38 mm. Cada avaliação consistiu de cinco



presença dos antagonistas. Isso indicou a inibição *in vitro* do crescimento micelial do patógeno na presença dos antagonistas. Contudo, o isolado P23, do gênero *Pseudomonas*, foi a rizobactéria que demonstrou maior potencial antagonístico contra o patógeno, destacando-se estatisticamente dos outros tratamentos, seguida por P41 e P22 e por B23 e B14, que não diferiram estatisticamente entre si, mas diferiram do tratamento testemunha (Figura 2).

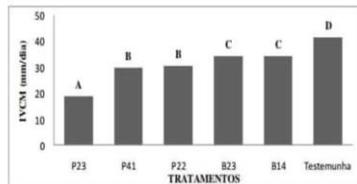


Figura 2- Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de *Colletotrichum graminicola* na presença de rizobactérias.

Resultados semelhantes ao que está sendo relatado no presente estudo foram descritos por Kumar e Dubey (2012), onde bactérias do gênero *Bacillus* são relatadas como produtoras de metabólitos com potencial inibidor sobre fungos como *Fusarium* spp. e *Colletotrichum* spp. Segundo Kupper et al. (2003), a inibição do crescimento do patógeno ocorre porque rizobactérias antagonísticas, como as dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, de modo geral, agem significativamente por antibiose, parasitismo ou competição por nutrientes, ou todos os mecanismos simultaneamente.

Conclusão

As rizobactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* testadas apresentaram níveis diferentes de inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum graminicola*.

A rizobactéria P23, do gênero *Pseudomonas*, provocou maior inibição *in vitro* contra *C. graminicola*, apresentando potencial de uso em futuros programas de controle biológico da antracnose foliar do milho.



Referências Bibliográficas

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; SCHAFFERT, R. E. Physiological races of *Colletotrichum graminicola* in Brazil. In: MILLIANO, W. A. J.; FREDERIKSEN, R. A.; BENGSTRON, G. D. (Ed.). *Sorghum and millets: a second world review*. Pantacheru: International Crops Research Institute for Semi-Arid Tropics, 1992. p. 209-212.

COSTA, R. V.; CASELA, C. R.; ZAMBOLIM, L.; FERREIRA, A. S. A antracnose do sorgo. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, n. 4, p. 345-354, 2003.

GHINI, R.; NAKAMURA, D. Seleção de antagonistas e nutrientes que induzem supressividades de solo a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em microcosmos e *in vivo*. *Summa Phytopathologica*, v. 27, n. 3, p. 318-322, 2001.

KUMAR, P.; DUBEY, R. C. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research*, v. 167, n. 8, p. 493-499, 2002.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.

NIETSCHKE, S. A.; BORÉM, A.; CARVALHOS, G. A.; PAULA JÚNIOR, T. J.; FERREIRA, C. F.; BARROS, E. G.; MACEDO, M. A. Genetic diversity of *Dhrosia* species in the State of Minas Gerais, Brazil.

Annexe

Annexe 1

Les milieux de cultures

1-Le milieu PDA : (potato dextrose Agar) (Jehnston et booth, 1983)

Pomme de terre.....	250g
Dextrose.....	20g
Agar.....	20g
Eau distillée.	

2-Le milieu TSA : (Gélose trypticase soja) (Camille, 2014)

Peptone de caséine.....	15g
Peptone de soja.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Gélose	15g
Eau distillée.	

3-Le milieu à base de l'extrait de malt :

La gélose à l'extrait de malt ou Malt-Agar est un milieu de culture en biologie. Elle est aussi appelée "GEM" (pour Gélose à l'Extrait de Malt) ou "MEA" (de l'anglais Malt Extract Agar).

Extrait de malt déshydraté.....	30,0 g
Agar.....	12,0 à 15,0 g
pH = 5,5	

Eau distillée.

4-le milieu PDB (Potato Dextrose Broth) :

Potato Dextrose Broth est la même formule que Potato Dextrose Agar, mais l'agar a été omis.

5-le milieu NA (Nutrient Agar) :

Peptone	0,5%.
---------------	-------

Agar1,5%.
 Extrait de levure0,3%.
 chlorure de sodium0,5%.
 Eau distillée.

PH ajusté à neutre (6,8).

La gélose nutritive est un milieu à usage général favorisant la croissance d'un large éventail d'organismes non exigeants.

6-le milieu Carnation Leaf Agar (CLA) :

Agar20mg/L
 CMA17 g/L.
 Glycérol250 ml/l.

7- le milieu YPG ((Yeast-extract-Peptone-Glucose-Agar) :

Glycérol.....3%
 Tampon citrate..... 0,05M
 d'acide citrique..... 10g/L
 PH.....5
 Minéraux
 Agar-agar
 Eau

Annexe 2

Matériels non biologiques

Verreries	Appareillages
Boîte du Pétri	Incubateur BOD
Anse	Appareils de chauffage
Etaloir en verre	Spectrophotomètre
les tubes à essai en verre	Microscope
Aérosol	Agitateur rotatif
Emporte-pièce	Électrophorèse

tubes Eppendorf	Thermocycleur
Fioles Erlenmeyer	vortex
tige de verre	
Emporte-pièce	
baguette de verre	
anse de platine	

Annexe 3

espèce	Code
<i>F .pseudograminearum</i>	G2
<i>F.culmorum</i>	C1

Annexe 4

Appareillage

1-Incubateur bactériologique BOD

L'incubateur BOD est appelé incubateur à basse température et sont utilisés pour la croissance des levures et des moisissures car ils nécessitent de basses températures pour se développer. Cet incubateur s'appelle BOD (Demande biologique en oxygène) parce que des températures basses autour de 20-25°C sont nécessaires dans le incubateur à demande biologique en oxygène test, donc à ne pas confondre avec le terme, car le but d'un Incubateur DBO est également identique à un incubateur bactérien. Il y a à la fois un système de refroidissement et un système de chauffage dans un Chambre DBO, ce qui le différencie d'un incubateur bactérien. Les incubateurs BOD ne sont pas affectés par le milieu environnant et sont complètement indépendants.



Incubateur bactériologique BOD

2- La spectrophotométrie

Est le domaine qui étudie la mesure de l'énergie transportée par les rayonnements électromagnétiques dans le domaine de la lumière visible. La spectrométrie, ou spectroscopie, est une méthode analytique quantitative et qualitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée, généralement en solution. Plus l'échantillon est concentré, plus il absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer-Lambert.



Spectrophotomètre

Kit ELISA (enzyme-linked immunoassay).

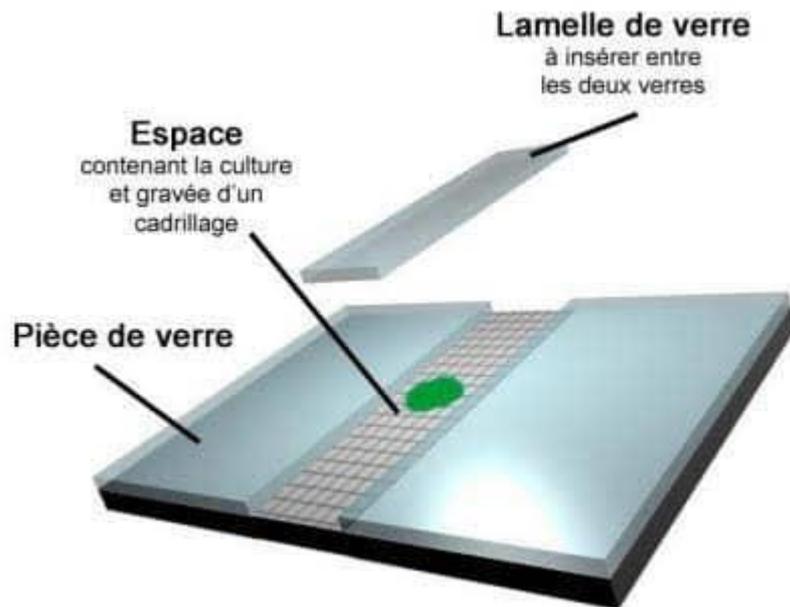


—
—

Kit RIDASCREEN DON



Cellule Malassez



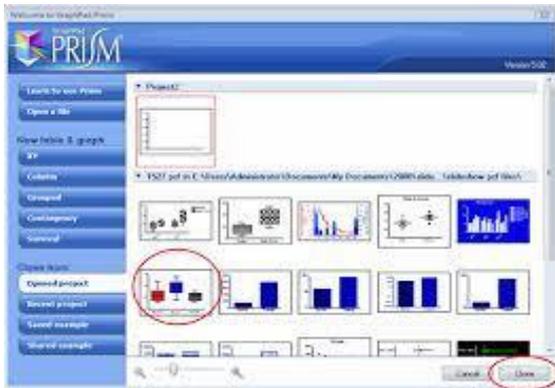
Annexe 5

Logiciels et formule

1-Logiciel GraphPad Prism

GraphPad Prism est une solution d'analyse et de représentation graphique conçue pour analyser des données scientifiques. Ce logiciel est l'un des meilleurs choix pour les

chercheurs, supérieur aux tableurs, et offre une pléthore de choix d'analyse et de modèles de graphiques.



Logiciel GraphPad Prism

2-Un logiciel d'ascension multiskan



3-Le test Anova traitement Dunnet (bilatéral)

L'ANOVA univariée est généralement utilisée lorsque l'on a une seule variable indépendante, ou facteur, et que l'objectif est de vérifier si des variations, ou des niveaux différents de ce facteur ont un effet mesurable sur une variable dépendante. L'analyse de variance permet simplement de répondre à la question de savoir si tous les échantillons suivent une même loi normale. Dans le cas où l'on rejette l'hypothèse nulle, cette analyse ne permet pas de savoir quels sont les échantillons qui s'écartent de cette loi (Winer, Michels, & Brown, 1991).

Annexe 6

Fiche technique du Maïs

Description de la plante :

Le maïs est une plante herbacée annuelle de hauteur variable et constituée d'une tige unique de gros diamètre, constituée d'un empilement de nœuds et d'entrenœuds. Au niveau de chaque nœud sont insérés une feuille et un bourgeon axillaire.

Consommation animale du Maïs par le bétail :

La plante entière peut être consommée par le bétail comme fourrage frais ou sec ou comme ensilage. Le maïs est une plante d'élevage, elle permet donc d'engraisser plus rapidement les bovins et augmente ainsi la production de lait des vaches. La teneur assez faible du maïs en protéines et sa relative pauvreté en lysine et méthionine obligent à avoir recours à des compléments plus riches en azote. En cas de déficit fourrager, notamment en période de sécheresse, les résidus de culture du maïs-grain (tiges et feuilles, rafles) peuvent aussi être donnés aux ruminants d'élevage.

Les farines de maïs et la farine de gluten de maïs sont très utilisées dans la fabrication des aliments concentrés pour ruminants et des aliments pour porcs et volailles. Pour les ruminants, l'aplatissage des grains est cependant suffisant.

Les germes de maïs non déshuilés peuvent être utilisés dans l'alimentation des volailles ou des porcs. Après déshuilage, il reste un tourteau utilisable dans l'alimentation des ruminants.

Au niveau mondial, les deux tiers du maïs produit sont utilisés pour l'alimentation animale, 27 % pour l'alimentation humaine principalement à travers les produits de la maïserie.