



## *Avant- propos*

**Nom et prénom de l'auteur :** EL MINAOUI Fatima Ezzahraa

**Intitulé du travail :** Evaluation du pouvoir insecticide et fongicide des souches bactériennes isolées des racines du cactus vis-à-vis de la cochenille du cactus (*Dactylopius opuntiae*) et de champignons phytopathogènes.

**Nom et Prénom de la directrice des travaux de recherche :** Madame AMIR Soumia, Professeure de l'Enseignement Supérieur, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc.

**Nom et Prénom de la co-directrice des travaux de recherche :** Madame Ilham Zahir, Professeur Habilité, Faculté Poly-disciplinaire, Université Sultan Moulay Slimane, Béni Mellal, Maroc.

**Laboratoire de déroulement des travaux :** Laboratoire polyvalent de recherche et de développement (LPVRD), Faculté Poly-disciplinaire, Université Sultan Moulay Slimane, Béni Mellal, Maroc.

**Début des travaux de recherche :** Février 2019.

### **Publications :**

1. **Fatima Ezzahra El Minaoui**, Ayoub Haouas, Anas Tallou, Omar Bouhnik, Khadija Atif, Ilham Zahir, Soumia Amir «**Insecticidal activity of cactus root-associated bacteria against *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) females and nymphs**».
2. **Fatima Ezzahra El Minaoui**, Anas Tallou, Ayoub Haouas, Khadija Atif, Mohammed Yasser Jamali, Ilham Zahir, Soumia Amir «**Review of the different strategies carried out to manage cochineal insect (*Dactylopius opuntiae*)** ».
3. Ayoub Haouas, **Fatima Ezzahra El Minaoui**, Anas Tallou, Omar Bouhnik, Ilham Zahir, Aziz Faissal, Soumia Amir «composting». Accepted in Waste Biorefinery, 2021.
4. Anas Tallou, Faissal Aziz, A. J. Garcia, Francisco Pedrero Salsedo, **Fatima Ezzahraa El Minaoui**, Soumia Amir «Bio - fertilizers issued from anaerobic digestion for growing tomatoes under irrigation by treated wastewater: targeting circular economy concept». published article in International Journal of Environmental Science and Technology, 2021.
5. Soumia Amir, Khadija Atif, Ayoub Haouas, Ilham Zahir, Anas Tallou, **Fatima Ezzahra El Minaoui**, Omar Bouhnik, Mohammed Yasser Jamali and El Khadir Mustapha «Potential for Bio Control of Fungal Phytopathogens by *Pseudomonas Aeruginosa* CFSP1L1 Isolated from a Matured Compost Sample» Published in Journal of Bioremediation & Biodegradation, 2021.

## Communications :

1. **Fatima Ezzahraa El Minaoui**, Ayoub Haouas, Khadija Atif, Anas Tallou, Mohammed Yasser Jamali, Ilham Zahir, Soumia Amir «Insecticidal activity of *Pseudomonas aeruginosa* extract on the false carmine *Dactylopius opuntiae*» 1st international congress SUSTAINABLE AGRICULTURE : TOOLS AND INNOVATION «Agrinov 2021», FST Beni Mellal, Morocco, on 27-30th October 2021. Oral Presentation.
2. Anas Tallou, Ayoub Haouas, Khadija Atif, **Fatima Ezzahraa El Minaoui**, Mohammed Yasser Jamali, Francisco Pedrero Salsedo, Faissal Aziz, Soumia Amir «Biofertilizers issued from anaerobic digestion of olive mill wastewater with phosphate residues and applied on tomatoes : targeting circular economy concept» 1st international congress SUSTAINABLE AGRICULTURE : TOOLS AND INNOVATION «Agrinov 2021», FST Beni Mellal, Morocco, on 27-30th October 2021. Oral Presentation.
3. Ayoub Haouas, Anas Tallou, **Fatima Ezzahraa El Minaoui**, Soumia Amir «Evaluation of the fertilizing capacity of composts produced from bio-waste and phosphate additive in deficient soils». Oral Presentation.
4. **Fatima Ezzahraa El Minaoui**, Ayoub Haouas, Khadija Atif, Anas Tallou, Mohammed Yasser Jamali, Ilham Zahir, Soumia Amir «Biological control of tomato early blight by *Bacillus amyloliquefaciens* strains and their bioactive compounds » 1st international congress SUSTAINABLE AGRICULTURE : TOOLS AND INNOVATION «Agrinov 2021», FST Beni Mellal, Morocco, on 27-30th October 2021.
5. Khadija Atif, MY Jamali, Faissal Aziz, Ayoub Haouas, **Fatima Ezzahraa El Minaoui**, Anas Tallou, Ilham Zahir, Soumia Amir « Pathogens evolution during the composting of the household waste mixture enriched with phosphate residues and olive mill wastewater» 7<sup>ème</sup> édition du congrès international : Eaux, Déchets & environnement (EDE7), EST Salé-UM5 de Rabat, du 20 au 22 Novembre 2019. Oral Presentation.

## إهداء

{الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي لَهُ مَا فِي السَّمَاوَاتِ وَمَا فِي الْأَرْضِ وَلَهُ الْحَمْدُ فِي الْآخِرَةِ وَهُوَ الْحَكِيمُ الْخَبِيرُ}

إلى من كان رفيقي لحوال مساري الجامعي ومن هو قدوتي ... جدي

إلى من أفضله على نفسي، والذي لم يتهاون يوما في توفير سبيل الخير والسعادة لي ... والذي

إلى من وضعني على طريق الحياة، من ضحت ولم تدخر جهدا لإسعادي ... أمي

إلى من أغمرني بالحب، الاهتمام والامومة... جدتي وخالاتي

إلى أختائي وأخي، أصحاب الوجه الصيب، والأفعال الحسنة

إلى أصدقائي وكل أفراد عائلتي الذين أحبهم وأحترمهم.

إلى أساتذتي.

أقدم لكم هذا البحث، وأتمنى أن يحوز على رضاكم وأشكر كل فرد كان مندا لي خلال هذه الفترة

وكل من آمن بي ووجهني إلى المسار الأفضل.

## *Remerciement*

Pour moi, cette thèse n'aurait pas été possible de la réaliser sans la gentillesse, l'assistance et l'humour d'un très grand nombre de personnes. J'aimerais donc les remercier d'avoir participé à ce travail et de m'avoir soutenue le long de ces années du travail, en sachant qu'il en existe d'autres qui restent cachées derrière chaque mot de ce manuscrit.

Tout d'abord, je souhaite adresser ma gratitude à Mr. **MELLIANI Said**, Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques, Mr **HAFID Abderrafia**, vice doyen de la Faculté des Sciences et Techniques, et Mr. **EL HADADI Benachir**, Doyen de la Faculté Polydisciplinaire de Béni Mellal, Université Sultan Moulay Slimane de Béni Mellal, pour l'intérêt et le soutien qu'ils portent pour la recherche scientifique au sein de l'université.

Il m'est également agréable de remercier chaleureusement mes rapporteurs de thèse, Mr. **Charkaoui EL MODAFAR**, professeur à la FSTG Marrakech, Mr. **Abdelmajid HADDIOUI**, professeur à la FST Beni Mellal et Mme. **Sanaa SABOUR ALAOUI**, professeure à la FP Beni Mellal d'avoir acceptés de juger et évaluer ce travail

Je remercie vivement Madame **AMIR Soumia** qui a accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire, et de m'encadrer le long de ses quatre années. Vous étiez mon idole dès la première fois que vous m'avais appris en classe de SVI en 2012, et vous l'êtes toujours. Pour moi, vous étiez plus qu'une encadrante, mais une amie. Comment également ne pas évoquer ici nos nombreuses discussions ainsi que les nombreux conseils que vous m'aviez donnés, merci infiniment Madame.

Je suis aussi reconnaissante à Madame **ZAHIR Ilham**, professeure à la Faculté Polydisciplinaire de Beni Mellal, pour son intérêt qu'il a apporté à avancer mon travail. Je tiens à lui exprimer ma gratitude pour son endurance, sa serviabilité et surtout son aide. Je n'oublierai jamais combien vous m'avez aidé et vous étiez là pour moi, malgré vos nombreuses préoccupations.

J'adresse ma gratitude et mes remerciements à mes amis et collègues du laboratoire **HAOUAS Ayoub**, **TALLOU Anas** et **ATIF Khadija**. J'avais la chance de vous avoir trouvés au laboratoire, vous m'avez appris beaucoup de choses que ce soit lors des travaux de paillasse ou lors de la rédaction. Sans vous, je ne serais pas arrivé à ces résultats.

Je désire également remercier chaleureusement Monsieur **BOUHNIK Omar** pour sa disponibilité constante et sa serviabilité. Sans vous, une partie importante de cette thèse ne pourrait pas être réalisée.

Enfin je renouvelle toute mon amitié et ma sympathie à ceux qui m'ont accordé du temps et m'ont témoigné un soutien constant tout le long de ce travail de recherche.

## Résumé

Dans le cadre de la lutte contre la cochenille (*Dactylopius opuntiae*), insecte qui s'attaque au cactus (*Opuntia ficus indica*), le contrôle biologique a un grand potentiel dans le contexte actuel qui assure également la diminution de l'utilisation des produits chimiques.

Ainsi, dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à isoler et sélectionner des bactéries des racines du cactus et à étudier leur activité insecticide contre la cochenille du cactus et aussi contre trois champignons phytopathogènes: *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* et *Verticillium dahliae*.

Pour atteindre ces objectifs, l'efficacité des isolats pour la gestion de la fausse cochenille à carmin *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hémiptères: Dactylopiidae) a été évaluée en laboratoire et en serre. Ainsi, parmi les 62 bactéries isolées de la rhizosphère des cactus, cinq isolats bactériens ont montré une activité insecticide élevée contre les larves et les femelles adultes de la cochenille. Le séquençage du gène de l'ARNr 16S a été utilisé pour identifier ces cinq isolats qui ont été attribués, respectivement, à : *Bacillus subtilis* (Bm1A), *Sphingobium yanoikuyae* (Bm2B), *Priestia aryabhatai* (Bm3C), *Bacillus licheniformis* (Bm4D) et *Bacillus halotolerans* (BME8).

A l'exception de la souche *Sphingobium yanoikuyae* (Bm2B), toutes ces souches sont des bactéries à Gram+ et supportent des conditions de stress jusqu'à 12% du sel,  $T^{\circ} > 50^{\circ}\text{C}$ , stress hydrique jusqu'à 25%. En faisant la caractérisation des traits PGPR de ces bactéries, ce sont *Bacillus Subtilis*, *Priestia aryabhatai*, et *Bacillus halotolerans* qui ont démontré un pouvoir de fixation de l'azote atmosphérique et un pouvoir de solubilisation du phosphate en milieu PVK (indice de solubilisation entre 2,12-1,83). Alors que parmi ces trois, seule *Bacillus halotolerans* a démontré un pouvoir de solubilisation du zinc. Tandis que la production des enzymes hydrolytiques ( $\alpha$ -amylase, protéase, cellulase), de l'acide indole acétique, des sidérophores varient entre ces bactéries.

Par la suite, l'efficacité de l'utilisation des souches et leurs extraits dans le biocontrôle de la cochenille et sa larve a été testée *in vitro* ou *in vivo*. Les résultats obtenus varient en fonction de la souche en question, le stade de vie de l'insecte, conditions de tests *in vivo* ou *in vitro* et en fonction de l'effet de chaque souche sur la biodégradation ou l'hémolyse de la cire protectrice de l'insecte. Ainsi, la souche *Bacillus halotolerans* (BME8) a causé la létalité des femelles adultes et des larves à faible concentration  $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup> en 24 h, en plus de son potentiel de dégradation des filaments cireux protecteurs. Aussi, elle a démontré le taux de mortalité de cochenille le plus élevée en serre (à  $10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>). Alors que, la souche *Priestia aryabhatai* (Bm3C) était la plus rapide en laboratoire, aboutissant à la létalité à  $10^7$  CFU.mL<sup>-1</sup> dans un temps très court 12 h. En revanche, Bm4D a montré une toxicité modérée pour les femelles adultes et les larves en laboratoire, mais une activité importante dans l'hémolyse de la cire dans quelques minutes en serre. L'application de la souche *Bacillus subtilis* (Bm1A) a aussi efficacement hémolysé la cire de couverture de l'insecte. Aussi, malgré son efficacité modérée dans les expériences de laboratoire, c'était le deuxième traitement le plus efficace en serre avec un taux de survie de 55% à  $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>, démontrant son pouvoir de dégradation de la cire hydrophobe protectrice des femelles de cochenille. D'autre part, les cinq souches ont montré un effet antagoniste élevé contre les champignons phytopathogènes *in vitro*.

**Mots clés :** Biocontrôle, lutte antiparasitaire, cactus, cochenille, souches rhizosphériques, champignons phytopathogènes.

## Abstract

In the fight against the cochineal (*Dactylopius opuntiae*), an insect that attacks the cactus (*Opuntia ficus indica*), biological control has great potential in the current context also ensures the limitation of chemical inputs.

Thus, in the present work, we were interested in isolating and selecting bacterial strains from the cactus rhizosphere and studying their insecticidal activity against the cochineal insects and also against three phytopathogenic fungi: *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* and *Verticillium dahliae*.

To reach these aims, the effectiveness of antagonistic bacteria for managing the false carmine scale insect *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Dactylopiidae) was evaluated in the laboratory and in the greenhouse. Thus, among the 62 bacteria isolated from the rhizosphere of cacti, five bacterial isolates showed high insecticidal activity against the larvae and adult females of the cochineal. The sequencing of the 16S rRNA gene was used to identify these five effective isolates which have been assigned, respectively, to: *Bacillus subtilis* (Bm1A), *Sphingobium yanoikuyae* (Bm2B), *Priestia aryabhatai* (Bm3C), *Bacillus licheniformis* (Bm4D) and *Bacillus halotolerans* (BME8).

All these strains are Gram+ and withstand stress conditions up to 12% of salt,  $T^{\circ} > 50^{\circ}\text{C}$ , water stress up to 25% except for the *Sphingobium yanoikuyae* strain (Bm2B). By characterizing the PGPR traits of these bacteria, *Bacillus Subtilis*, *Priestia aryabhatai*, and *Bacillus halotolerans* demonstrated a binding power in fixing the atmospheric nitrogen and a solubilization power of P in PVK medium (solubilization index between 2.12-1.83). Of these three, only *Bacillus halotolerans* have demonstrated a Zn solubilization power. Whereas the production of hydrolytic enzymes ( $\alpha$ -amylase, protease, cellulase), AIA, and siderophores vary among these bacteria.

After that, except for *Sphingobium yanoikuyae* (Bm2B), which demonstrated less resistance to saline, water and climatic stresses, the effectiveness of the other strains and their bioactive substances on the biocontrol of the cochineal females and nymphs was tested *in vitro* or *in vivo*. The results obtained vary depending on the strain in question, the life stage of the insect, *in vivo* or *in vitro* test conditions and the effect of each strain on the biodegradation or hemolysis of the protective wax of the insect. Thus, *Bacillus halotolerans* strain (BME8) caused the lethality of adult females and larvae at a low concentration of  $10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup> in 24 h, in addition to its potential for degradation of protective waxy filaments. Also, it has demonstrated the highest mealybug mortality rate in greenhouses (at  $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>). Whereas, *Priestia aryabhatai* strain (Bm3C) was the fastest in the laboratory, reaching the lethality at  $10^7$  CFU.mL<sup>-1</sup> in a very short time 12 h. In contrast, Bm4D showed a moderate toxicity to adult females and larvae in the laboratory, but significant activity in wax hemolysis within a few minutes in the greenhouse. The application of *Bacillus subtilis* strain (Bm1A) also effectively hemolyzed the insect's covering wax. Also, despite its moderate effectiveness in laboratory experiments, it was the second most effective treatment in greenhouses with a survival rate of 55% at  $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>, demonstrating its power to degrade the protective hydrophobic wax of mealybug females. On the other hand, the five strains showed a high antagonistic effect against phytopathogenic fungi *in vitro*.

**Keywords :** Biocontrol, pest control, cactus, cochineal, rhizospheric strains, phytopathogenic fungi.

## ملخص

من اجل القضاء على الحشرة القرمزية (*Dactylopius opuntiae*) التي تهاجم نبات الصبار (*Opuntiae ficus*) (*indica*)، تعتبر المكافحة البيولوجية وسيلة فعالة لما لها من إمكانات تنموية كبيرة في السياق الحالي للحد من المدخلات الكيميائية.

لدا تهدف هذه الأطروحة إلى عزل واختيار سلالات بكتيرية من جذور الصبار ودراسة فعاليتها في القضاء على الحشرات القرمزية وأربعة فطريات ممرضة للنباتات *Fusarium oxysporum*، *Alternaria solani*، و *Verticillium dahliae*.

من اجل الوصول إلى هذه الأهداف، قد تم تقييم فعالية البكتيريا المعادية للحشرة القرمزية في المختبر وفي الدفيئة الزراعية. بالتالي من بين 62 بكتيريا معزولة من جذور الصبار، أظهرت خمس بكتيرية معزولة نشاطا مبيدا للحشرات ضد اليرقات والإناث البالغات للحشرة القرمزية. تم تحديد هوية سلالات البكتيرية باستخدام الحمض النووي الريبوزي (رنا RNAr) 16S على التوالي على انها: *Bacillus subtilis* (Bm1A) ، *Priestia aryabhatai* (Bm3C)، *Bacillus licheniformis* (Bm4D) و *Bacillus halotolerans* (BME8).

كل هذه السلالات هي بكتيريا Gram+ وتحمل ظروف الإجهاد تصل إلى 12 ٪ من الملح، ودرجة حرارة تفوق 50°C، وإجهاد مائي يصل إلى 25 ٪ باستثناء *Sphingobium yanoikuyae* (Bm2B). من خلال تحديد خصائص صفات تعزيز النمو لهذه البكتيريا، *Bacillus Subtilis*، *Priestia aryabhatai*، و *Bacillus halotolerans* أظهرت قوة ملزمة في تثبيت النيتروجين الجوي وقوة في تدوير الفوسفات في الوسط المغذي PVK (مؤشر النوبان بين 1.83-2.12). من بين هؤلاء الثلاثة، أظهرت *Bacillus halotolerans* فقط قوة ذوبان الزنك. إنتاج الانزيمات (بروتياز، الفا اميلاز، سيلولاز)، حمض الإندول-الخليك، و سيديروفور تختلف بين هذه البكتيريا.

و بالتالي، تم اختبار فعالية السلالات وموادها النشطة بيولوجيا على المكافحة الحيوية لليرقات والإناث البالغات للحشرة القرمزية في المختبر أو في الدفيئة الزراعية. تختلف النتائج التي تم الحصول عليها اعتمادا على السلالة المعنية، ومرحلة حياة الحشرة، وظروف الاختبار في الجسم الحي أو في المختبر وتأثير كل منها على التحلل البيولوجي أو انحلال للشمع الواقي للحشرة. وهكذا تسببت سلالة *Bacillus halotolerans* (BME8) في فتك الإناث البالغات واليرقات بتركيز منخفض قدره  $10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup> في غضون 24 ساعة، بالإضافة إلى قدرتها على اتلاف الخيوط الشمعية الواقية. أيضا، فقد أظهرت أعلى معدل وفيات اناث الحشرة القرمزية في الدفيئات (في  $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>). في حين أن سلالة *Priestia aryabhatai* (Bm3C) كانت الأسرع في المختبر، مما أدى إلى الفتك 100 ٪ بتركيز  $10^7$  CFU.mL<sup>-1</sup> في وقت قصير جدا (12 ساعة). في المقابل، أظهرت Bm4D سمية معتدلة للإناث البالغات واليرقات في المختبر، ولكن نشاطا كبيرا في انحلال الشمع في غضون بضع دقائق في الدفيئة. كما أن سلالة *Bacillus subtilis* (Bm1A) حلت بشكل فعال الخيوط الشمعية. أيضا، على الرغم من فعاليتها المعتدلة في التجارب المعملية، فقد كانت ثاني أكثر العلاجات فعالية في الدفيئة الزراعية بمعدل بقاء 55 ٪ عند  $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>، مما يدل على قدرتها على تدمير الشمع الواقي للإناث الحشرة القرمزية. من ناحية أخرى، أظهرت السلالات الخمس تأثيرا عاليا ضد الفطريات المسببة للأمراض النباتية في المختبر.

**الكلمات الرئيسية:** المكافحة الحيوية، مكافحة الآفات، الصبار، الحشرة القرمزية، سلالات بكتيرية، الفطريات المسببة للأمراض النباتية.



# Sommaire

|  |      |
|--|------|
| <i>Avant- propos</i> .....   | I    |
| <i>Remerciement</i> .....  | IV   |
| <i>Résumé</i> .....  | V    |
| <i>Abstract</i> .....  | VI   |
| <i>ملخص</i> .....  | VII  |
| Liste des figures .....  | XII  |
| Liste des tableaux .....   | XIII |
| Liste des abréviations .....   | XIV  |
| Introduction générale.....   | 1    |
| Chapitre I : Étude bibliographique .....   | 5    |
| A.    Figuier de barbarie ( <i>Opuntia ficus indica</i> ) .....                    | 6    |
| I.    Histoire d' <i>Opuntia ficus-indica</i> et de ses plantations au Maroc ..... | 6    |
| II.   Taxonomie et description.....  | 6    |
| III.  Différentes utilisations d' <i>OFI</i> .....                                 | 7    |
| IV.  Phytochimie .....   | 8    |
| 1.  Les cladodes.....  | 8    |
| 2.  Les fruits .....   | 8    |
| 3.  Les pelures .....  | 9    |
| 4.  Les graines .....  | 9    |
| V.   Activités biologiques .....   | 9    |
| VI.  Maladies du figuier de barbarie .....   | 9    |
| 1.  Désordres abiotiques.....  | 9    |
| 2.  Maladies causées par des virus .....   | 10   |
| 3.  Maladies causées par des bactéries .....                                       | 10   |
| 4.  Maladies causées par des levures.....  | 10   |
| 5.  Maladies causées par des champignons .....                                     | 11   |
| 6.  Maladies causées par des ravageurs.....  | 13   |
| B.    Cochenille ( <i>D. opuntiae</i> ) .....                                      | 17   |
| I.    Biologie et cycle de vie de <i>Dactylopius opuntiae</i> .....                | 17   |

|   |    |
|---|----|
| 1. Le premier stade.....  | 18 |
| 2. Le deuxième stade.....   | 18 |
| 3. Le stade adulte .....  | 19 |
| I. Répartition de <i>D. opuntiae</i> dans le monde .....  | 19 |
| II. Répartition de <i>D. opuntiae</i> au Maroc.....   | 20 |
| III. Conséquences des attaques de <i>D. opuntiae</i> .....  | 20 |
| IV. Moyens de lutte.....  | 21 |
| 1. Lutte chimique .....   | 21 |
| 2. Sélection génétique .....  | 23 |
| 3. Lutte biologique .....   | 23 |
| Chapitre II : Isolement et identification des bactéries isolées de la rhizosphère du cactus ( <i>Opuntia ficus indica</i> ) à pouvoir insecticide vis-à-vis la cochenille ( <i>Dactylopius opuntiae</i> ) .. 29 |    |
| A. Introduction .....   | 30 |
| B. Matériel et méthodes .....   | 30 |
| I. Isolement des bactéries de la rhizosphère du cactus.....   | 30 |
| II. Criblage des isolats bactériens à pouvoir insecticide vis-à-vis la cochenille <i>Dactylopius opuntiae</i> .....   | 30 |
| III. Confirmation du pouvoir insecticide vis-à-vis la cochenille .....  | 31 |
| 1. Collecte de cladodes sains et de cladodes infecté.....   | 31 |
| 2. Pouvoir insecticide des isolats bactériens <i>in vitro</i> .....   | 31 |
| 3. Pouvoir insecticide des isolats bactériens <i>in vivo</i> .....  | 31 |
| IV. Identification des isolats bactériens à pouvoir insecticide.....  | 32 |
| 1. Identification macroscopique.....  | 32 |
| 2. Identification microscopique.....  | 32 |
| 3. Tests biochimiques.....  | 32 |
| 4. Identification moléculaire .....   | 34 |
| V. Attribut de la promotion de la croissance des plantes par les souches sélectionnées  | 36 |
| 1. Fixation d'azote .....   | 36 |
| 2. Solubilisation de phosphate .....  | 36 |
| 3. Solubilisation de zinc .....   | 36 |
| 4. Solubilisation de potassium .....  | 37 |
| 5. Production de l'acide indole acétique (AIA) .....  | 37 |

|  |   |    |
|--|---|----|
| 6.   | Production des sidérophores .....   | 37 |
| C.   | Résultats et discussion .....   | 38 |
| I.   | Isolement et criblage des bactéries de la rhizosphère du cactus à pouvoir insecticide vis-à-vis la cochenille <i>Dactylopius opuntiae</i> ..... | 38 |
| II.  | Confirmation du pouvoir insecticide vis-à-vis la cochenille .....   | 38 |
| 1.   | Pouvoir insecticide des isolats bactériens <i>in vitro</i> .....  | 38 |
| 2.   | Pouvoir insecticide des isolats bactériens <i>in vivo</i> .....   | 43 |
| III.   | Identification des isolats bactériens à pouvoir insecticide .....   | 45 |
| 1.   | Identification macroscopique et microscopique .....   | 45 |
| IV.  | Attributs de promotion de la croissance des plantes .....   | 55 |
| 1.   | Fixation d'azote .....  | 55 |
| 2.   | Solubilisation de phosphate .....   | 55 |
| 3.   | Solubilisation de zinc et de potassium .....  | 56 |
| 4.   | Production de l'AIA et sidérophores .....   | 58 |
| V.   | Discussion .....  | 59 |
| VI.  | Récapitulation .....  | 62 |
| Chapitre III : Activité antifongique des souches bactériennes isolées des racines du cactus « <i>Opuntia ficus indica</i> » vis-à-vis <i>Fusarium oxysporum f. sp. albedinis</i> , <i>Alternaria solani</i> et <i>Verticillium dahliae</i> ..... |   |    |
| A.   | Introduction .....  | 64 |
| B.   | Matériel et méthodes .....  | 65 |
| I.   | Effet antifongique des souches bactériennes isolées des racines du cactus .....   | 65 |
| 1.   | Souches bactériennes .....  | 65 |
| 2.   | Souches fongiques .....   | 65 |
| 3.   | Etude de l'antagonisme bactérie-champignon <i>in vitro</i> .....  | 66 |
| II.  | Extraction des principes actifs des souches bactériennes isolées de la rhizosphère du cactus .....  | 66 |
| III.   | Effet antifongique des extraits des souches bactériennes isolées de la rhizosphère du cactus .....  | 67 |
| C.   | Résultats .....   | 67 |
| I.   | Effet antifongique des souches bactériennes isolées de la rhizosphère du cactus .....   | 67 |
| 1.   | Effet inhibiteur des souches contre <i>Fusarium oxysporum albedinis</i> (FOA) .....   | 68 |
| 2.   | Effet inhibiteur des souches contre <i>Alternaria solani</i> .....  | 68 |

|      |   |    |
|------|---|----|
| 3.   | Effet inhibiteur des souches contre <i>Verticillium dahliae</i> .....                                 | 69 |
| II.  | Effet antifongique des extraits des souches bactériennes isolées de la rhizosphère<br>du cactus ..... | 70 |
| III. | Discussion .....  | 71 |
| D.   | Récapitulation .....  | 74 |
|      | Conclusion générale et perspectives.....  | 75 |

## Liste des figures

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1 :</b> <i>Opuntia ficus-indica</i> ..  | 7  |
| <b>Figure 2 :</b> Champ de figuier de barbarie avant et après l'attaque de la cochenille dans la région de Khémisset ..   | 16 |
| <b>Figure 3:</b> Cycle biologique de l'œuf à l'adulte ..  | 18 |
| <b>Figure 4:</b> Le male et la femelle de la cochenille, <i>Dactylopius opuntiae</i> (Hemiptera: Dactylopiidae) ..  | 19 |
| <b>Figure 5 :</b> Taux de survie des femelles adultes de <i>D. opuntiae</i> exposées à cinq concentrations des quatre isolats Bm1A, Bm3C, Bm4D et BME8 ..                               | 40 |
| <b>Figure 6 :</b> Taux de survie des larves de <i>D. opuntiae</i> exposées à cinq concentrations des quatre isolats Bm1A, Bm3C, Bm4D et BME8 ..   | 43 |
| <b>Figure 8 :</b> La production de l' $\alpha$ -amylase (A) et de cellulose (B) par les isolats ..  | 48 |
| <b>Figure 9 :</b> Arbre phylogénétique voisin basé sur les séquences de gènes d'ARNr 16S des souches Bm1A, Bm3C et BME8 et d'espèces apparentées au sein du genre <i>Bacillus</i> ..... | 52 |
| <b>Figure 10 :</b> Arbre phylogénétique voisin basé sur les séquences de gènes d'ARNr 16S de la souche Bm3C et des espèces apparentées du genre <i>Priestia</i> ..                      | 53 |
| <b>Figure 11 :</b> Arbre phylogénétique voisin basé sur les séquences de gènes d'ARNr 16S de la souche Bm2B et des espèces apparentées du genre <i>Sphingomonas</i> .....               | 54 |
| <b>Figure 12 :</b> La solubilisation de phosphate en milieu PVK par les souches bactériennes .....  | 56 |
| <b>Figure 14 :</b> La production des sidérophores (A) et la production de l'AIA (B).....  | 58 |
| <b>Figure 15:</b> Effet inhibiteur des souches étudiées contre <i>Fusarium oxysporum albedinis</i> .....  | 68 |
| <b>Figure 16 :</b> Effet inhibiteur des souches étudiées contre <i>Alternaria solani</i> .....  | 69 |
| <b>Figure 17 :</b> Effet inhibiteur des souches étudiées contre <i>Verticillium dahliae</i> .....   | 70 |

## Liste des tableaux

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau I :</b> Les champignons phytopathogènes du figuier de barbarie .....   | 11 |
| <b>Tableau II :</b> Les ravageurs du figuier de barbarie.....   | 13 |
| <b>Tableau III :</b> Pourcentages de mortalité chez les larves et les femelles adultes de <i>D. opuntiae</i> par les insecticides chimiques ..... | 22 |
| <b>Tableau IV :</b> Propriétés macroscopiques et microscopiques des isolats bactériens .....  | 45 |
| <b>Tableau V:</b> Production des enzymes hydrolytiques par les isolats sélectionnés. ....   | 47 |
| <b>Tableau VI:</b> Tests de tolérance des isolats sélectionnés. ....  | 49 |
| <b>Tableau VII :</b> Pourcentage d'identité nucléotidique des isolats sélectionnés et des souches types les plus apparentées. ....                | 51 |
| <b>Tableau VIII:</b> Les attributs de la promotion de la croissance des plantes assurés par les souches sélectionnées.....                        | 57 |
| <b>Tableau IX:</b> Pourcentages d'inhibition des champignons phytopathogènes par les souches étudiées.....  | 67 |
| <b>Tableau X :</b> Activité inhibitrice des extraits des souches étudiées contre les champignons phytopathogènes.....                             | 71 |

## **Liste des abréviations**

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**AIA** : acide indole acétique

**ARN** : acide ribonucléique

**ARNr** : ARN ribosomique

**BHT** : hydroxytoluène butylé

**CAM** : métabolisme acide crassulacé

**CFU** : unité formant colonie

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

**IS** : Indice de solubilisation

**NCBI** : National Center for Biotechnology Information

**ONSSA** : Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires

**PCR** : Réaction en chaîne par polymérase

**PGPR** : Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes

**PMV** : Plan Vert Marocain

**rpm** : Tour par minute

# **Introduction générale**



L'agriculture au Maroc est un secteur économique important du pays (Debbab, 2014). Il contribue à hauteur de 14 à 15% du Produit intérieur brut national (PNUE, 2016). Cependant, face aux grands efforts déployés par le Maroc afin de faire prospérer l'agriculture, celle-ci souffre, entre autres, d'une grande problématique à savoir l'attaque des champs cultivés par des insectes ravageurs et des phytopathogènes causant ainsi de sérieux dégâts dans la culture des plantes économiquement importantes (Zahir et al., 2018).

Citons, entre autres, la cochenille du carmin, *Dactylopius opuntiae* (Cockerell, 1896), est un ravageur dévastateur des plantations d'*Opuntia ficus-indica*. Cette cochenille a été détectée pour la première fois au Maroc, en 2015, lors d'un échantillonnage dans la région de Sidi Bennour (Douar Saniet Berguig) et qui a engendré des dégâts énormes dans plusieurs plantations de figuier de barbarie aux différentes régions du pays (Bouharroud et al., 2016). Effectivement, les attaques de ce redoutable ravageur sont rapides et imprévisibles, et par conséquent, la destruction d'importantes superficies plantées en cactus connaît une extension fulgurante et dangereuse dans plusieurs bassins de production au Maroc. C'est le cas notamment dans les régions de Doukkala et de Rhamna où plus de 50 000 hectares ont été totalement ou partiellement détruits (Bouharroud et al., 2016). Actuellement, l'attaque est répandue dans plusieurs provinces des Youssoufia, Béni Mellal, Khouribga et Agadir (Kidiss, 2016). Les pertes socioéconomiques et environnementales sont énormes (Bouharroud et al., 2016). En fait, la cochenille vit à la surface du cactus, habituellement en agrégats ou en colonies composées d'individus à différents stades du développement, installées à la base des épines. Tous les dégâts d'alimentation sont causés par les femelles et les nymphes car elles aspirent la sève par leurs pièces buccales suceuses. Elles passent toute leur vie au même endroit à sucrer la sève des cladodes et des fruits (FAO, 2018). Quelques semaines après leur installation sur une plante, des zones jaunes apparaissent sur le cladode. Les cladodes terminaux fortement infestés vont être déshydratés et tomberont finalement au sol (Eisner et al., 1994).

Par ailleurs, les champignons représentent les agents pathogènes qui affectent le plus les plantes à feuillage ornemental en leur causant des sérieuses maladies (Meddah, 2006). Effectivement, 10 à 30% des pertes économiques annuelles dans l'agriculture mondiale, avant et après la récolte, sont dues aux champignons (Batsch, 2011 ; Javier et al., 2014).

A titre d'exemple, le figuier de barbarie est touché par *Fusarium oxysporum* responsable de la fusariose, et *Alternaria* sp lié à l'alternariose (Granata et Sidoti, 2002 ; Granata et Sidoti, 2002).

Pour faire face à ces dégâts, plusieurs moyens de lutte sont employés dont la lutte chimique par les pesticides. Néanmoins, cette méthode a un impact négatif sur la santé humaine et

l'environnement. Effectivement, l'organisation mondiale de la santé a estimé qu'il y a chaque année dans le monde un million de graves empoisonnements par les pesticides. Chez l'enfant, par exemple, certains cancers comme les tumeurs cérébrales, leucémies et les néphroblastomes sont plus fréquemment associés à une exposition chronique aux pesticides (Debbab, 2014). Quant à l'échelle environnementale, les pesticides ont été mis en évidence dans tous les milieux tels que les eaux des rivières, les nappes phréatiques, l'air et les sols (Errami, 2012). Ainsi, ces molécules peuvent perturber l'équilibre des écosystèmes dans les zones d'application (Errami, 2012 ; Zahir, 2016). Indubitablement, il a été mis en évidence que les propriétés phytotoxiques des pesticides peuvent entraîner la destruction du phytoplancton et briser la chaîne trophique dans des écosystèmes aquatiques (Errami, 2012).

Un autre problème qui s'ajoute est celui du développement des pathogènes résistants à un ou plusieurs pesticides chimiques dû à la pression de sélection provoquée par les applications continues ou répétées de pesticides (Debbab, 2014 ; Zahir, 2016). De plus, la plupart des pesticides disponibles actuellement ne sont pas efficaces contre la cochenille du cactus (*Dactylopius opuntiae*). C'est le cas par exemple du chlorpyrifos d'éthyle (INRAE, 2015).

De ce fait, maintes investigations ont été menées pour trouver d'autres alternatives pour la protection des cultures qui sont non nuisibles à la santé, respectueuses à l'environnement et qui peuvent limiter les apports des pesticides (Ajouz, 2009 ; Zahir, 2016). Parmi ces techniques, figurent la recherche des variétés du cactus (*Opuntia ficus indica*) résistantes à la cochenille du cactus (*Dactylopius opuntiae*). Les chercheurs de l'INRA sont arrivés alors à la sélection de sept variétés résistantes du figuier de barbarie, qui sont nommées *Bellara*, *Merjana*, *Ghalia*, *Karama*, *Cherratia*, *Angad* et *Melk Zher* (Sbaghi et al. 2019).

D'autre part, la lutte biologique par l'emploi d'antagonistes bactériens et fongiques efficaces fait également partie des stratégies empruntées afin de gérer les ravageurs et les phytopathogènes (Nouayti *et al.*, 2018). Effectivement, ces micro-organismes contrôlent généralement leurs agents pathogènes cibles par différents mécanismes, y compris l'antibiose, le mycoparasitisme, la compétition pour l'espace et les nutriments, la production des enzymes lytiques ainsi que des métabolites secondaires, l'induction des systèmes de résistance des plantes et l'inactivation des enzymes des agents pathogènes (Nouayti *et al.*, 2018).

Ces caractéristiques marquent les traits des bactéries de la rhizosphère des plantes connus sous le nom de PGPR. En fait, ces PGPR peuvent agir positivement sur la croissance de la plante, en augmentant le prélèvement des éléments nutritifs du sol, en induisant et produisant des

régulateurs de croissance végétale et en activant les mécanismes de résistance induite chez d'autres végétaux. Autrement dit, ces bactéries stimulent à la fois la croissance des plantes et favorisent leur immunité.

Ainsi, les effets inhibiteurs des microorganismes vis-à-vis les phytopathogènes et les ravageurs sont de plus en plus explorés (Bahadou *et al.*, 2017 ; Ameer *et al.*, 2017 ; Mokhtari *et al.*, 2017 ; Nouayti *et al.*, 2018). Prenant par exemple le cas de certaines souches de *Bacillus subtilis* qui sont les plus étudiées (Anouar, 2012). Leur effet inhibiteur a été démontré contre *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* (Krebs *et al.*, 1998) et *Colletotrichum gloeosporioides* (Ashwini & Srividya, 2014). De plus, *Bacillus subtilis* est une bactérie très connue pour ses effets insecticides en agriculture. En effet, dans l'étude réalisée par Idris *et al.*, (2019) l'efficacité d'une solution enzymatique brute du micro-organisme sur *D. opuntiae* a été analysée. D'après les résultats obtenus, à la concentration de 35 %, l'extrait enzymatique brut a tué 50 % des femelles adultes et 98 % des larves. Alors qu'à 100 %, il tuait environ 90 % des femelles adultes et 100 % des larves. De plus, cet extrait enzymatique brut a été démontré efficace pour dégrader la couverture cireuse.

Cependant, cette investigation susmentionnée présente, au meilleur de nos connaissances, la seule étude mettant en évidence l'effet d'une souche bactérienne sur la mortalité de la cochenille de cactus.

C'est dans ce cadre que s'inscrit la thématique de ce présent travail qui consiste à préserver le figuier de barbarie et limiter l'utilisation des pesticides de synthèse. En fait, outre les efforts menés par l'INRA dans le sens de la recherche des génotypes résistants au ravageur, cette étude appuie le cadre de la gestion des équilibres entre le cactus et ledit ravageur tout en isolant et identifiant des bactéries à partir de la rhizosphère du cactus puis évaluant leur pouvoir insecticide éventuel contre le ravageur *D. opuntiae*.

Un autre objectif de ce travail concerne la mise en évidence de l'effet antifongique des isolats vis-à-vis *Fusarium oxysporum*, *Alternaria sp* et *Verticillium dahliae* qui sont des phytopathogènes dont certains peuvent également attaquer le figuier de barbarie.

# **Chapitre I : Étude bibliographique**

## **A. Figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*)**

### **I. Histoire d'*Opuntia ficus-indica* et de ses plantations au Maroc**

Le figuier de barbarie (*Opuntia ficus-indica*) est originaire du Mexique (El Kharrassi et al., 2016). Il a été transporté en Espagne par Christophe Colomb. Plus tard, en 1610, la plante est entrée dans les pays d'Afrique du Nord (Russell et Felker, 1987). Au Maroc, le cactus *Opuntia* a été transporté pour la première fois depuis l'Espagne au début du XVIIe siècle. Il est très répandu dans les régions rurales du Maroc. En 2014, on estimait que le figuier de barbarie couvrait environ 54 530 ha avec 11,07 % du total des arbres fruitiers du pays. La répartition géographique d'*OFI* au Maroc est très large du Sud (régions de Sidi Ifni et Tiznit) à l'extrême Nord (Tanger) en passant par les régions côtières, et aussi dans les zones continentales. Tiznit au Sud du Maroc est la région où le figuier est largement cultivé avec une superficie de 17 600 ha (Ait Baamrane, Sidi Ifni...).

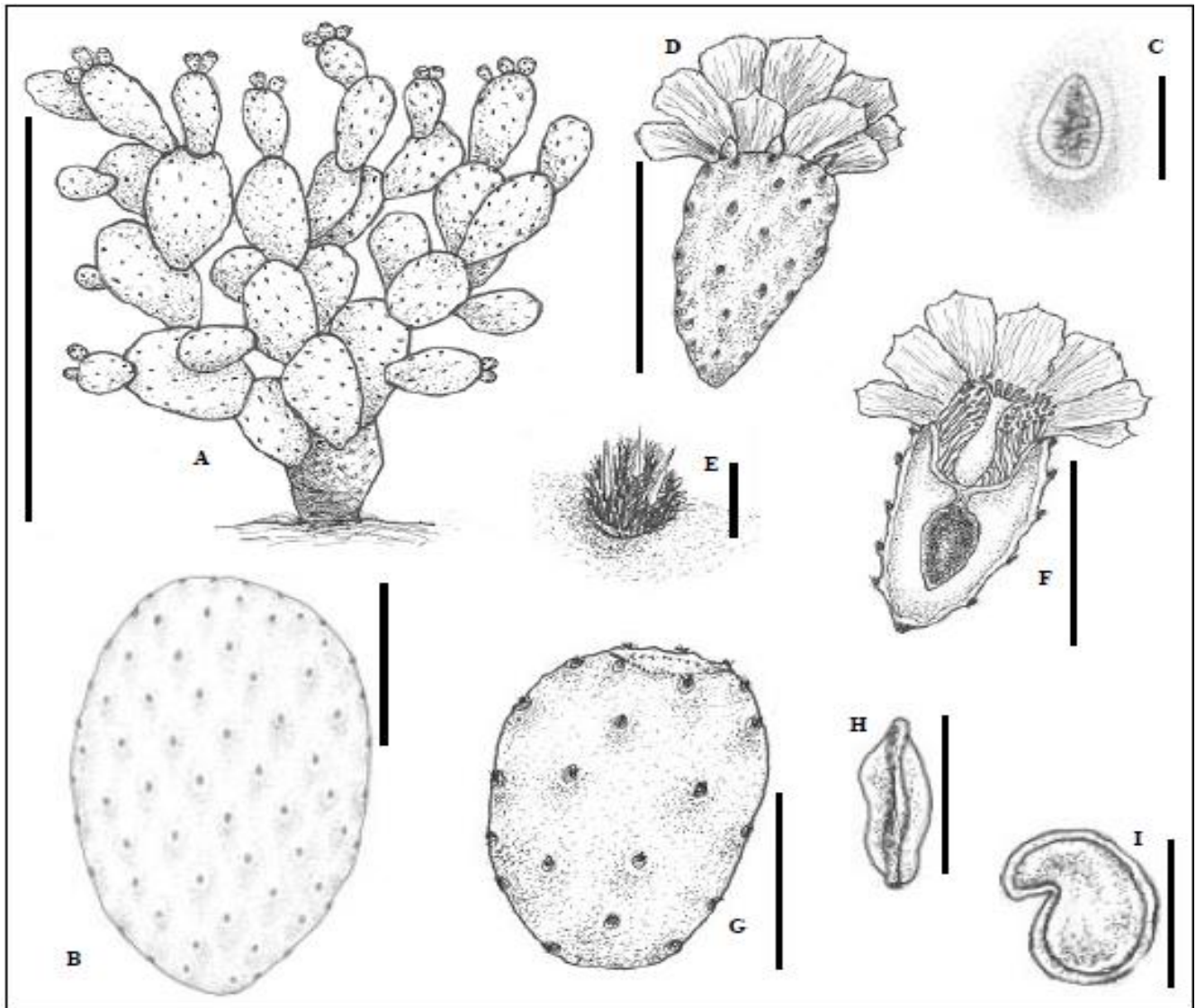
Les plantations réalisées dans les régions du Tensift et du Centre étaient pour limiter l'érosion dans ces régions. Alors que la meilleure qualité de figuier se situe dans les zones côtières où l'humidité est plus élevée et l'influence des conditions maritimes est présente (Essoukrati et al., 2014).

### **II. Taxonomie et description**

*Opuntia ficus-indica* (*OFI*) appartient à la famille des *Cactaceae*, sous-famille des *Opuntioideae*, genre *Opuntia* et sous-genre *Platy opuntia* (Aragona et al., 2018). L'arbre peut atteindre 3 à 5 mètres de haut. Le bourgeon floral commence d'Avril à Mai. Puis, après 21 à 47 jours (exactement de Mai à Juin), l'anthèse commence. La couleur des fleurs varie du jaune à l'orange. Enfin, les fruits apparaissent du Juillet à Août (Reyes-Agüero et al., 2006).

L'*OFI* a 3 parties importantes : les cladodes, les fleurs et les fruits, y compris les graines et la peau (figure 1).

La longueur des cladodes varie de 11 à 13 cm (Nerd et al., 1997) ; ils pèsent entre 40 et 1000 g (Feugang et al., 2006). Tandis que le poids du fruit varie entre 43 et 200 g (Ramírez-Rodríguez et al., 2020).



**Figure 1 :** *Opuntia ficus-indica*. A : l'arbre ; B : cladode ; C : aréole de cladode ; D : fleur ; E : aréole de fleur ; F : section longitudinale de fleur ; G : fruits ; H : vue dorsale de graines ; I : vue ventrale de semences. Mesures = 1m (A), 10 cm (B), 5 mm (C, E), 4 cm (D, F), 5 cm (G), 4 mm (H, I) d'après Reyes-Agüero et al. 2005.

### III. Différentes utilisations d'*OFI*

Outre les pastèques, les marocains consomment abondamment le fruit du figuier de barbarie en été. Par ailleurs, dans les villages pauvres du pays, ils ont développé des coopératives pour la production de produits à base du cactus, comme de la confiture, de l'huile et des produits de beauté, ce qui a permis aux femmes au foyer à gagner leur propre argent. En effet, il a été démontré que les extraits des fleurs peuvent être utilisés dans l'industrie alimentaire, les domaines pharmaceutiques et cosmétiques (Aruwa et al., 2018). Par ailleurs, une étude

comparative réalisée par El Kharassi et al., (2016) sur 30 variétés de cactus a montré que le cactus marocain est plus adapté à la production de jus (Salehi et al., 2019).

D'un point de vue environnemental, les agriculteurs des régions arides et semi-arides utilisent la plante *OFI* pour protéger leurs terres contre l'érosion. En outre, la poudre des cladodes, le mucilage et les biosorbants dérivés du *OFI* ont été utilisés dans l'assainissement des eaux usées contenant des pesticides, des colorants, des métaux lourds, caractérisées par un niveau élevé de turbidité et une demande chimique en oxygène élevée (Nharingo et Moyo, 2016). En fait, l'étude réalisée par Bouaouine et al., (2018) rapporte que l'*OFI* peut fortement nettoyer l'eau des colloïdes par un mécanisme de coagulation-floculation. Michelon et al., (2020) ont également constaté que l'*OFI* est le plus efficace dans le traitement de l'eau, où un taux d'élimination supérieur à 70% est atteint en 30 min maximum pour un nombre important de polluants comme *E. coli*, le fer et le nitrate.

#### **IV. Phytochimie**

*OFI* est une source importante de composés nutritionnels et bioactifs. Il est riche en vitamines, caroténoïdes, fibres alimentaires et polyphénols (Sánchez-Tapia et al., 2017, Mena et al., 2018). Il est à noter également que chaque partie de cette plante contient un nombre important de composés chimiques :

##### **1. Les cladodes**

Les cladodes contiennent du calcium (Ca), de l'oxalate de calcium ( $\text{CaC}_2\text{O}_4$ ), du magnésium (Mg), du sodium (Na), du potassium (K), du phosphore (P), du manganèse (Mn) et de la vitamine B (El-Mostafa et al., 2014). Mais le mucilage est le constituant fonctionnel majeur présent dans les cladodes avec 71%, tandis que les protéines sont le constituant mineur avec seulement 1,5% (Iturriaga et Nazareno, 2016).

##### **2. Les fruits**

Le fruit a un goût sucré (Ramírez-Rodríguez et al., 2020). De plus, c'est la partie d'*OFI* la plus riche en eau avec 94% (Salim et al., 2009), ainsi qu'en magnésium (Mg) et calcium (Ca) avec respectivement 59 mg/100 g et 98,4 mg/100g (Stintzing et al., 2001). Sa teneur en sucre est élevée (12 à 17 %), alors que sa teneur en acidité est faible (0,03 à 0,12 %) (Yahia et Mondragon-Jacobo, 2011). L'étude de Coria Cayupán et al., (2011) a montré que l'acide ascorbique dans les fruits *OFI* variait de 0,26 à 0,48 mg/g. Alors que les teneurs totales en composés phénoliques étaient comprises entre 0,54 et 1,2 mg d'acide gallique/g. De plus, la

vitamine K a été trouvée dans toutes les parties du fruit avec 0,5 à 1 g/Kg (El-Mostafa et al., 2014).

### **3. Les pelures**

Environ 90 % du poids des pelures de fruits sont composés de l'eau (Salim et al., 2009). Ce sont une source de fibres, d'acides gras, de vitamines, de glucides et d'autres composés (Aruwa et al., 2018).

### **4. Les graines**

Les graines sont riches en acides gras, vitamines, sucres et acides organiques (Aruwa et al., 2018). Elles sont utilisées pour l'extraction de l'huile de cactus. En termes de minéraux, les graines sont riches en calcium (Ca), magnésium (Mg), sodium (Na) et potassium (K) (El-Mostafa et al., 2014).

## **V. Activités biologiques**

*OFI* a de nombreuses activités biologiques. A titre d'exemple, il possède un effet antioxydant qui pourrait jouer un rôle important dans la prévention des maladies humaines (Abdel-Hameed et al., 2014). En effet, l'activité radicalaire anti-DPPH (DPPH : radical chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de la gomme de fruit *OFI* était comparable à celle du BHT (hydroxytoluène butylé, conservateur) (Salehi et al., 2019). De plus, il a été démontré qu'il avait la capacité de modifier la flore intestinale et de réduire l'endotoxémie métabolique. Il est également apte de corriger d'autres anomalies biochimiques liées à l'obésité telles que le peptide insulinothrombotique du glucose, l'intolérance au glucose, la lipogenèse et l'inflexibilité métabolique. Ces changements s'accompagnaient d'une réduction de la stéatose hépatique et du stress oxydatif dans le tissu adipeux et le cerveau (Sánchez-Tapia et al., 2017). Aussi, d'autres activités supplémentaires ont été mises en évidence en fonction de la partie explorée de la plante.

## **VI. Maladies du figuier de barbarie**

### **1. Désordres abiotiques**

Généralement, le froid et la grêle sont les seuls facteurs qui peuvent endommager le figuier de barbarie (Inglese et al., 2018). Les températures inférieures à -5° causent des blessures au niveau de toute la plante, alors que même les cladodes et les fruits juvéniles peuvent être percés par des coups de grêlon, ce qui entraîne des blessures à l'endroit de l'impact (Inglese et al., 2018).



## **2. Maladies causées par des virus**

### **2.1 Epaississement des cladodes**

Cette anomalie est caractérisée par un retard de la croissance, l'hypertrophie de la gaine et la perte de couleur verte des cladodes, ainsi que les plantes montrent une mauvaise nouaison, et les fruits sont peu nombreux et petits (Granata et Sidoti, 2002).

## **3. Maladies causées par des bactéries**

### **3.1 *Erwinia carotovora***

*Erwinia carotovora* est une bactérie qui cause une pourriture caractéristique du cladode, connue sous le nom de « la pourriture bactérienne molle noire » (Granata et Sidoti, 2002). Les symptômes apparaissent sur les cladodes sous forme de taches gorgées d'eau au printemps, et qui deviennent brunes par la suite (Varvaro et al., 1993). Cette maladie est présente en Italie, au Chili, au Mexique et en Argentine (Granata et Sidoti, 2002). En effet, il n'y a pas de traitement pour cette bactérie, mais les cladodes infectés doivent être éliminés et détruits pour éviter la propagation de la maladie.

### **3.2 *Agrobacterium tumefaciens***

*Agrobacterium tumefaciens* est une bactérie qui cause la maladie connue par la galle du collet. Elle est présente en Mexique (Hernández Gutiérrez, 1993). Les symptômes consistent en des masses tumorales pouvant atteindre 100 mm de diamètre et sont situés à la base de la tige (Granata et Sidoti, 2002). Malheureusement il n'y a pas un traitement pour cette maladie, mais on peut l'éviter par la plantation du figuier de barbarie dans des sols non infectés par cette bactérie.

## **4. Maladies causées par des levures**

### **4.1 *Candida boidinii***

*Candida boidinii* est une levure qui cause la maladie nommée pourriture molle des cladodes et qui est fréquemment associée à une tache bactérienne (Nobel et Nobel, 2002). Les premiers symptômes sont des zones noires causées par une infection interne des tissus sur les cladodes et les fruits, suivies d'une pourriture interne des tissus, après quoi la plante devienne une masse déliquescence (Nobel et Nobel, 2002). Les mesures de contrôle sont l'élimination et la destruction des cladodes infectés et l'application de bouillie bordelaise à 1% après des événements au cours desquels les cladodes ont été blessés (Granata et Sidoti, 2002).

## 5. Maladies causées par des champignons

Les champignons pathogènes du figuier de barbarie affectent fortement la rentabilité, la qualité et la quantité de la production. Ces phytopathogènes réduisent les défenses des plantes, provoquant des maladies et des pertes de qualité dans le monde entier qui s'élèvent à des milliards de dollars américains par an (Shuping et Eloff, 2017). Le tableau I montre les principaux champignons qui attaquent le figuier de barbarie.

**Tableau I :** Les champignons phytopathogènes du figuier de barbarie (Inglese et al., 2018)

|                                  | <b>Gamme haute</b>                               | <b>Symptômes</b>   | <b>Distribution</b>   | <b>Gestion de la maladie</b>  |
|----------------------------------|--|--|---|---|
| <i>Pseudocercospora opuntiae</i> | - <i>Opuntia spp.</i> ,<br>- <i>Nopalea spp.</i> | - Décoloration de la cuticule<br>- Brunissement des cladodes<br>- Effondrement des tissus                        | Bolivie,<br>Brésil,<br>Mexique,<br>Pérou.                   | - Eliminer les cladodes dès l'apparition des premiers symptômes de la maladie.<br>- Utilisation des fongicides            |
| <i>Lasiodiplodia theobromae</i>  | Plus de 500 hôtes                                | - Pourriture des cladodes et des fruits  | Afrique du Sud, Brésil, Egypte, Amérique, Italie, Mexique   | - Eliminer et détruire les spécimens malades<br>- Utilisation des fongicides (thiabendazole et thiophanat-méthyle)        |
| <i>Alternaria spp.</i>           | Très polyphage                                   | Apparition des points chlorotiques circulaires autour des épines ou des blessures sur les cladodes ou les fruits | Argentine, Italie, Brésil, Egypte, Mexique, Afrique du Sud. | - Utilisation des fongicides (cuivre, mancozebe ou l'iprodione)   |
| <i>Armillaria mellea</i>         | Très polyphage                                   | La pourriture des racines et des tiges   | Italie, Etats-Unis<br>D'Amérique.                           | - Eviter de cultiver le cactus dans un sol infecté par ce champignon<br>- Aucun fongicide n'est disponible pour le moment |

|  |  |   |                         |   |
|--|--|---|-------------------------|---|
| <b><i>Sclerotinia sclerotiorum</i></b>                 | Très polyphage   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- La pourriture blanche sur les cladodes</li> <li>- Apparition des sclérotés noirs sur les tissus pourris</li> </ul> | Chili, Mexique          | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Retirer et détruire les cladodes infectés</li> </ul>   |
| <b><i>Aecidium opuntiae</i><br/><i>Magn</i></b>        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Opuntia spp.</i>,</li> <li>- <i>Bouteloua simplex</i> Lag.</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Apparition des pustules jaune-oranges sur la surface des cladodes ou des fruits</li> </ul>                         | Bolivie, Italie, Pérou. | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Retirer et enterrer les cladodes infectés</li> </ul>   |
| <b><i>Scytalidium lignicola</i><br/><i>Pesante</i></b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Auricularia polytricha</i>,</li> <li>- <i>Citrus paradisi</i>,</li> <li>- <i>Mangifera indica</i>,</li> <li>- <i>Manihot esculenta</i>,</li> <li>- <i>Vanilla fragrans</i>,</li> <li>- <i>humains et animaux</i>.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pourriture sèche des cladodes</li> </ul>   | Brésil                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Retirer et enterrer les cladodes infectés</li> </ul>   |
| <b><i>Phytophthora nicotianae</i></b>                  | Très polyphage   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- La pourriture du pied est l'exsudat de gomme suintant de la base de la tige.</li> </ul>                            | Italie                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cultiver le figuier de Barbarie dans des sols bien drainés pour éviter l'engorgement.</li> </ul> |
| <b><i>Pythium aphanidermatum</i></b>                   | Très polyphage   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Apparition des lésions molles, brun foncé sur le cladode au niveau de la ligne du sol.</li> </ul>                  | Mexique                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Éviter l'excès d'eau et maintenir un bon drainage du sol</li> </ul>                              |

|   |  |   |                         |   |
|---|--|---|-------------------------|---|
| <i>Fusarium oxysporum f. sp. Opuntiarum</i> | - <i>Echinocactus grusoni</i> ,<br>- <i>Schlumbergera truncate</i> . | - Pourriture racinaire avec une décoloration rouge intense des tissus affectés. | Brésil, Italie          | - Planter dans des sols bien drainés et réduire la compaction du sol      |
| <i>Botrytis cinerea Pers</i>                | Très polyphage   | - Pourriture des fruits.<br>- Décomposition des tissus internes.                | Italie                  | - Eviter les blessures pendant la récolte et les opérations post-récolte  |
| <i>Penicillium spp.</i>                     | Très polyphage   | - Pourriture des fruits après la récolte  | Partout dans le monde   | - Application des pratiques hygiéniques lors de la récolte et l'emballage |
| <i>Macrophomina phaseolina</i>              | Très polyphage   | - Pourriture molle brune s'étendant au fruit entier après la récolte            | Italie, Brésil, Mexique | - Application des pratiques hygiéniques lors de la récolte et l'emballage |

## 6. Maladies causées par des ravageurs

Plus de 160 espèces d'insectes sont nuisibles pour les cactus et sont se sont adaptées aux conditions générales des régions dans lesquelles leur plantes hôtes croissent (Inglese et al., 2018). Dans le tableau II, les principaux ravageurs du figuier de barbarie sont présentés.

**Tableau II :** Les ravageurs du figuier de barbarie

| Insecte                      | Distribution                              | Zone d'attaque | Risque   | Références                                   |
|------------------------------|---|----------------|--|--|
| <i>Cactoblastis cactorum</i> | Amérique du Nord, Afrique du Sud, Mexique | Cladodes       | Ils consomment tous les tissus internes du cladode | (Zimmermann, 2002 ; Zimmermann et al., 2004) |

|                                    |                         |                  |  |                                    |
|------------------------------------|-------------------------|------------------|--|------------------------------------|
| <i>Olycella nephelepsa</i>         | Mexique                 | Cladodes         | Ils attaquent seulement les jeunes vergers du cactus dans leurs trois premières années ; les dégâts sont localisés | (Badii et Flores, 2001)            |
| <i>Megastes cyclades</i>           | Mexique, USA            | Cladodes         | Ils causent l'effondrement des branches principales et des tiges des cactus.                                       | (Nobel et Nobel, 2002)             |
| <i>Metapleura potosi</i>           | Australie, Mexique      | Cladodes, fruits | Ils causent une pourriture partielle ou la chute des cladodes au sol   | (Mann, 1969)                       |
| <i>Metamasius spinolae</i>         | Afrique du Sud, Mexique | Tige             | Quelques larves se nourrissant à la base de la tige peuvent détruire une plante entière                            | (Nobel et Nobel, 2002)             |
| <i>Gerstaeckeria spp</i>           | Mexique                 | Tige, cladodes   | Ils sont actifs seulement la nuit et les femelles pondent des œufs à l'intérieur des cladodes                      | (O'Brien, 1970)                    |
| <i>Cylindrocopturus biradiatus</i> | Mexique                 | Cladodes         | Les femelles utilisent les cladodes pour l'oviposition et le développement des larves                              | (Castañeda-Vildózola et al., 2021) |
| <i>Moneilema variolis</i>          | Mexique                 | Tige, cladodes   | Deux ou trois larves seulement à la base d'un cactus peuvent mener à l'effondrement de la plante.                  | (Mann, 1969)                       |
| <i>Chelinidea tabulata</i>         | Mexique                 | Fruit            | Elles représentent moins de dégâts sur les cactus  | (Castañeda-Vildózola et al., 2021) |

|                                 |                             |                     |   |  |
|---------------------------------|-----------------------------|---------------------|---|--|
| <i>Narnia femorata</i>          | Mexique, USA,<br>Costa Rica | Fruit               | Elles représentent moins de dégâts sur les cactus   | (Cirino et Miller, 2017; Inglese et al., 2018)       |
| <i>Hesperolabops nigriceps</i>  | Mexique                     | Cladodes            | Des populations denses causent une apparence jaune et malade aux cladodes, spécialement dans les vergers nouvellement plantés | (Inglese et al., 2018; Palomares-Pérez et al., 2010) |
| <i>Asphondylia opuntiae</i>     | Mexique, USA,<br>Australie  | Graines             | L'attaque de ces moucheron a pour effet d'inhiber le développement de la graine.  | (Hamlin, 1926)                                       |
| <i>Lonchaea Alexanderi</i>      | Mexique                     | Cladodes            | Elles représentent moins de dégâts sur les cactus   | (Mann, 1969)   |
| <i>Diaspis echinocacti</i>      | Mexique                     | Cladodes,<br>fruits | Elles représentent moins de dégâts sur les cactus   | (Oetting, 1984)                                      |
| <i>Neohydatothrips opuntiae</i> |                             | Cladodes,<br>fruits | Elles représentent moins de dégâts sur les cactus   | (Hernández Navarro, 2013)                            |

D'après le tableau II, il est évident que *OFI* est un bon habitat et également un repas pour plusieurs ravageurs mais la cochenille *Dactylopius opuntiae*, est le plus dur, qui ait menacé et détruit les cactus partout dans le monde, y compris dans notre pays. La figure 2 montre un champ de figuier de barbarie avant et après l'attaque de la cochenille dans la région de Khémisset (33.860165, -6.164736).



**Figure 2 :** Champ de figuier de barbarie avant et après l'attaque de la cochenille dans la région de Khémisset (33.860165, -6.164736).

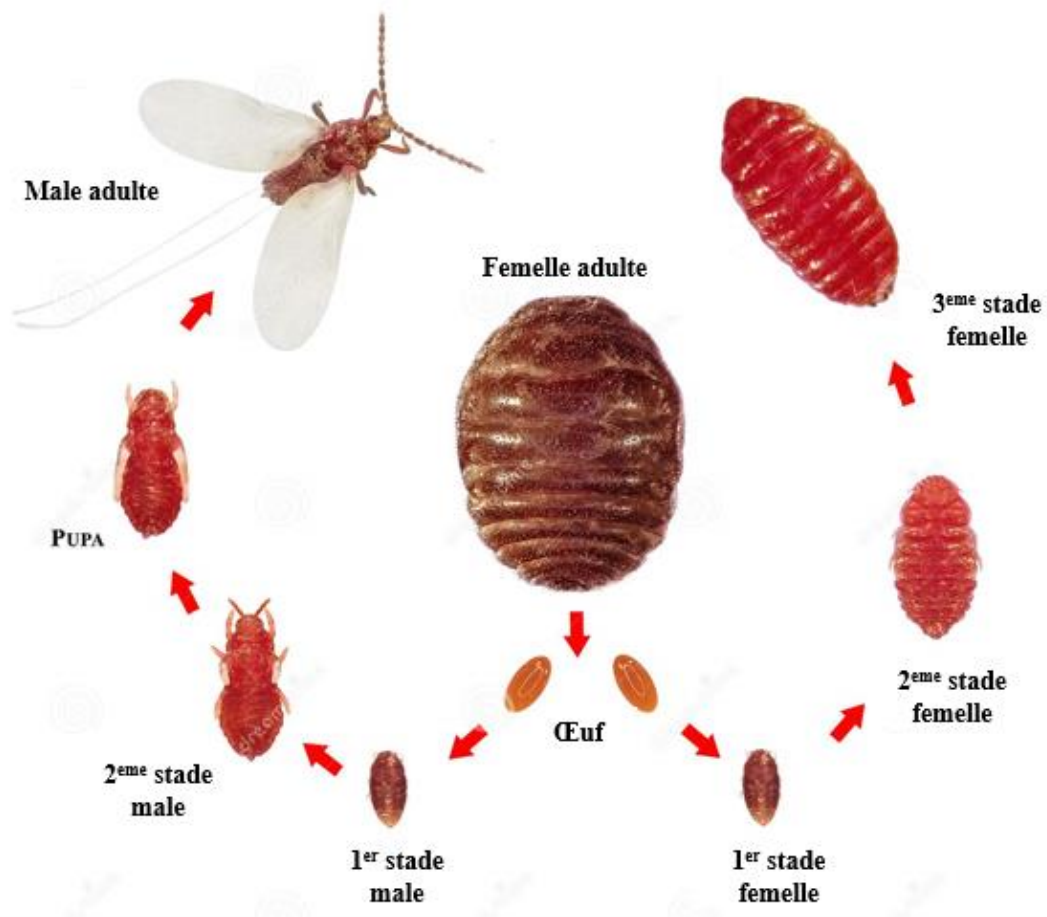
## **B. Cochenille (*D. opuntiae*)**

### **I. Biologie et cycle de vie de *Dactylopius opuntiae***

La cochenille sauvage est un insecte qui appartient à la famille des *Dactylopiidae* (MJ et al., 2015). Cette famille est composée de 10 espèces : *D. opuntiae*, *D. austrinus* De Lotto, *D. bassi*, *D. tomentosus*, *D. ceylonicus*, *D. coccus*, *D. confertus* De Lotto, *D. confusus*, *D. salmianus* De Lotto et *D. zimmermanni* (Torres et Giorgi, 2018). Ces insectes sont considérés comme la principale source d'acide carminique. Ce dernier est utilisé comme pigment dans les industries alimentaires, pour les applications pharmaceutiques, cosmétiques, textiles, et autres en raison de ses propriétés colorantes de haute qualité (Vera-Ponce de León et al., 2016, Vigueras et Portillo, 2016).

*Dactylopius opuntiae* vit dans les régions semi-arides, car les basses températures et la pluie menacent sa vie et ralentissent la durée de son cycle de vie (Inglese et al., 2017). Les femelles sont les plus parthénogènes et elles n'ont pas besoin du mâle pour s'accoupler et pour se reproduire (MJ et al., 2015). Leur taille varie entre 4 et 6 mm, attachées aux cladodes et recouvertes de fils cireux qui protègent leur corps de la pluie et du soleil et réduisent aussi l'efficacité de la lutte chimique. Alors que les mâles sont plus petits et mobiles grâce à leurs ailes (Flores et al., 2013 ; Inglese et al., 2017 ; RW Dapson, 2007). Leur cycle de vie varie de 40 à 60 jours pour accomplir le développement de l'œuf à l'adulte (Torres et Giorgi, 2018), ce qui aboutit à quatre générations ou plus par an (MJ et al., 2015). Chaque femelle pond de 150 à 160 œufs (Badii et Flores, 2001). Par la suite, trois stades de développement différents sont observés (figure 3) :





**Figure 3:** Cycle biologique de l'œuf à l'adulte (Liberato Portillo et Ana Lilia Vigueras. 2018)

### 1. Le premier stade

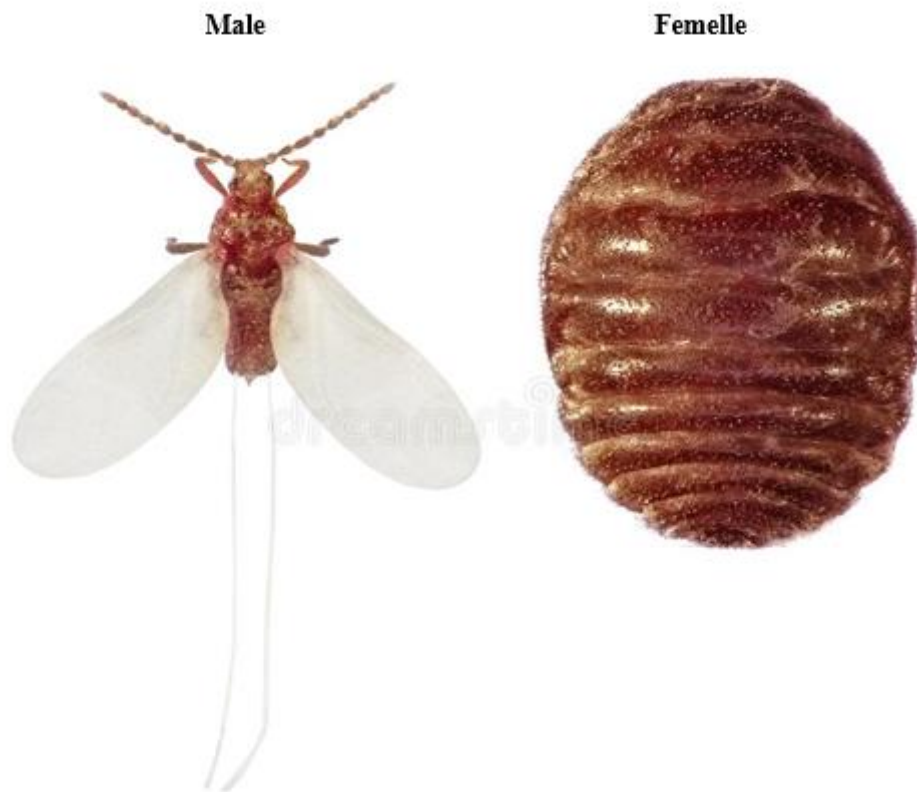
Selon Palafox-Luna et al., (2018) la larve du premier stade chez le mâle est plus longue que chez les femelles. C'est à ce stade que l'on peut observer la différence entre les deux sexes. Les larves femelles deviennent plus grosses que les mâles et se déplacent loin de leurs mères et se fixent dans une nouvelle place pour se nourrir des cladodes. Tandis que les mâles restent attachés à leurs mères (Torres et Giorgi, 2018).

### 2. Le deuxième stade

Contrairement au premier stade, la durée du deuxième stade est plus longue pour les femelles que pour les mâles (Palafox-Luna et al., 2018). Les femelles fixent leurs pièces buccales dans le cladode et commencent à se couvrir de cire (Inglese et al., 2017). Tandis que les mâles rétractent leurs pièces buccales et vont chercher un autre site dans le cladode pour développer la pupa en environ une semaine ou plus (Palafox-Luna et al., 2018).

### 3. Le stade adulte

Comme le montre la figure 4, les femelles deviennent encore plus grosses en raison de la production d'œufs et se couvrent complètement de cire blanche (Inglese et al., 2017 ; Palafox-Luna et al., 2018). En revanche, les mâles deviennent ailés et commencent à voler et cherchent à rencontrer les femelles (Inglese et al., 2017).



**Figure 4:** Le male (à gauche) et la femelle (à droite) de la cochenille, *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) (photo prise par Alex et Natali Protasov).

#### I. Répartition de *D. opuntiae* dans le monde

Au Brésil, *Dactylopius opuntiae* « Cockerell » a été importé pour la première fois du Mexique, afin de produire du colorant (colorant carmin). Par la suite, ce ravageur s'est largement répandu dans le monde, non pas pour la même raison, mais à cause des activités humaines culturelles et économiques (Chavez-Moreno et al., 2009). Il a été trouvé en Inde, Afrique du Sud, Australie, France, États-Unis, Palestine, Sri Lanka, Pakistan, Kenya, Maroc, Tunisie, Liban, Jordanie et Syrie (Diniz et al., 2020 ; Rodrı et Mora-aguilera, 2016 ; Zimmermann et Moran, 1991).

## **II. Répartition de *D. opuntiae* au Maroc**

Depuis sa première apparition dans la région de Doukkala (centre du Maroc), la cochenille a dévasté toute la production de cactus de la région, puis l'infestation s'est propagée très rapidement aux autres régions productrices de cactus (Haouz, Safi, Ben-Mellal, Chaouia, Oriental et Souss) (Sbaghi et al., 2019).

## **III. Conséquences des attaques de *D. opuntiae***

La cochenille couvre plus de 75% de la surface des cladodes, qui jaunissent, les fruits se flétrissent et le cactus meurt. Après son installation sur la plante, les femelles de *D. opuntiae* commencent à se reproduire, et à côté des larves, elles commencent à se nourrir de la sève des cladodes, provoquant la chlorose et la chute prématurée des cladodes puis la mort de la plante (Vigueras et Portillo, 2016). Les conséquences de ce ravageur résident dans la baisse de la production, le manque de commercialisation des produits du cactus et ses dérivés, ce qui affecte les secteurs économique et agricole.

De nombreux pays ont été touchés par *D. opuntiae*. Par exemple, au Mexique, la cochenille a causé de graves dommages entraînant un faible taux de production et des centaines d'hectares ont été détruits (Rodri et Mora-aguilera, 2016). Alors qu'au Brésil, les agriculteurs ont subi d'énormes pertes dues à la cochenille puisque plus de 100 hectares ont été détruits (perte d'environ 25 millions de dollars). De même, la région du Moyen-Orient n'a pas été épargnée par les effets néfastes du ravageur. Par exemple, au Liban, la cochenille a été signalée pour la première fois dans le sud du pays en 2012 dans la région de Nabatieh. Ensuite, le suivi réalisé en 2014 a montré que ce ravageur était répandu et que les dégâts étaient très sévères sur les figuiers de barbarie dont les fruits contribuent aux revenus des agriculteurs de la région. En outre, une nouvelle infestation a été observée en 2015 dans les régions de Jezzine et du Chouf, situées à 18 km du premier site de détection (Moussa et al., 2017).

D'un autre part, la première apparition de ce ravageur en Jordanie a eu lieu dans le nord (à Saham et Rafais) où les cladodes de figuiers de barbarie ont été totalement infestés, et de nombreux cactus sont morts (M. Katbeh Bader et H. Abu-Alloush, 2018). Il est probablement introduit dans cette région depuis la Palestine et le Liban.

## IV. Moyens de lutte

La cochenille a été utilisée au début comme moyen de contrôle biologique d'*Opuntia ficus indica* au Mexique et est finalement devenue un ravageur sérieux dans le monde entier. La lutte contre cet insecte est devenue une priorité pour protéger le reste de figuier de barbarie au Maroc comme dans de nombreux autres pays.

### 1. Lutte chimique

L'application des produits phytosanitaires et chimiques est couramment utilisée pour contrôler et réduire les impacts de la cochenille (Diniz et al., 2020). Dans ce cadre, de nombreux insecticides ont été testés sur *D. opuntiae* comme le chlorpyrifos, la lambda-cyhalothrine, l'acétamipride et le thiaméthoxame (Lopes et al., 2018). Il convient de signaler que le chlorpyrifos est un pesticide organophosphoré utilisé pour lutter contre les ravageurs des cultures et des ménages (Barr Dana B. et Angerer Jürgen, 2006). Alors que la lambda-cyhalothrine est un insecticide pyréthroïde des coléoptères, des pucerons, des coléoptères, des lépidoptères et d'autres parasites (He et al., 2008). L'acétamipride est un insecticide néonicotinoïde, utilisé pour lutter contre les espèces d'hémiptères, de lépidoptères et de thysanoptères (Yao et al., 2006). Enfin, le thiaméthoxame est l'insecticide le plus vendu des néonicotinoïdes de deuxième génération, utilisé contre les ravageurs du sol et du feuillage (Maienfisch et al., 2001).

Une étude sur la lutte chimique de la cochenille a été réalisée en comparant l'effet de différents insecticides (tableau III). Les auteurs ont montré que l'insecticide le plus efficace était le chlorpyrifos, causant la mort de 93 % des larves et 82 % des femelles à une concentration très faible (0,75 ml.L<sup>-1</sup>). Ensuite, c'était la lambda-cyhalothrine avec un score de mortalité de 62 à 99% des femelles adultes. Alors que l'acétamipride, n'a tué que 60% des larves et des femelles à une concentration de 0,125 g.L<sup>-1</sup>. Enfin, le thiaméthoxame cause la mortalité de 64 et 75 % des larves et des femelles respectivement à 0,10 g/L.

D'autre part, Zeitoun et al., (2020) ont comparé Sulfoxaflor ; un insecticide spécial pour les insectes se nourrissant de sève (Babcock et al., 2011 ; Zhu et al., 2011) avec le Diflubenzuron, qui est un insecticide découvert par Philips -Duphar (Ker, 1977), et connu par l'inhibition de la synthèse de la chitine (Soltani et al., 1983). Les deux insecticides ont été appliqués sur des cladodes à infection modérée (dans le respect des Bonnes Pratiques Agricoles BPA). En effet, tous les insectes mâles adultes étaient morts après 4 jours, alors que 48% des femelles étaient mortes après 48 h de traitement au Diflubenzuron. Progressivement, la mortalité a augmenté

jusqu'à 81 % lorsque de l'huile minérale a été ajoutée. Alors que, pour Sulfoxaflor, 95% des femelles sont mortes en 48h, et 98% avec l'ajout d'huile minérale.

Sur la base de ces deux études, le chlorpyrifos et le sulfoxaflor sont les insecticides les plus efficaces contre *D. opuntiae*. En effet, l'Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires (ONSSA) au Maroc a autorisé la vente des 16 marques d'insecticides à cochenille. Six d'entre eux sont composés de Chlorpyrifos (CIRODAN, PYCHLOREX 48 EC, CHOKE, DURACID 48 EC, KEMBAN 48 EC et PYRICAL 480), suivi du pyriproxifen (ADMIRAL, PROXIMO et GENERAL 100 EC), sulfoxaflor (DURSBAN 4), acétamipride (MOSPILAN 20 SP), spirotétramate (MOVENTO 100 SC) et des huiles minérales.

Néanmoins, ces insecticides ont des impacts négatifs sur le sol, les plantes et la santé humaine (Sbaghi et al., 2019). De plus, la résistance et l'accumulation de résidus de ces produits dans les cladodes du cactus présente un autre défi. Par conséquent, la recherche de nouvelles méthodes et alternatives pour surmonter ce problème a été menée (Diniz et al., 2020).

**Tableau III** : Pourcentages de mortalité chez les larves et les femelles adultes de *D. opuntiae* par les insecticides chimiques

| Produit chimique          | Concentration | Efficacité en femelles adultes (%) | Efficacité en larves (%) | Références            |
|---------------------------|---------------|------------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| <b>Chlorpyrifos</b>       | 0.75 ml/L     | 82                                 | 93                       |                       |
| <b>Acetamiprid</b>        | 0.125 g/L     | 60                                 | 60                       |                       |
| <b>Thiamethoxam</b>       | 0.10 g/L      | 75                                 | 64                       | (Diniz et al. 2020)   |
| <b>Lamba-cyhalothrin</b>  | 0.50 ml/L     | 62                                 | 53                       |                       |
| <b>Diflubenzuron</b>      | 0.329 kg/ha   | 72                                 | -                        |                       |
| <b>Sulfoxafor</b>         | 0.179 kg/ha   | 81                                 | -                        | (Zeitoun et al. 2020) |
| <b>Mineral oil</b>        | 10ml/L        | -                                  | 98                       |                       |
|                           | 24 ml/L       | 99%                                | -                        |                       |
| <b>Azadirachtin</b>       | 0.2 ml/L      | -                                  | 68                       |                       |
|                           | 0.6 ml/L      | 23                                 | -                        |                       |
| <b>Malathion</b>          | 2 ml/L        | -                                  | 95                       |                       |
|                           | 3 ml/L        | 79                                 | -                        |                       |
| <b>Alpha-cypermethrin</b> | 1.5 ml/L      | -                                  | 96                       |                       |
|                           | 2.25 ml/L     | 82                                 | -                        | (Aalaoui et al. 2019) |
| <b>Pyriproxifene</b>      | 0.37 ml/L     | -                                  | 98                       |                       |
|                           | 0.37 ml/L     | 70                                 | -                        |                       |

## 2. Sélection génétique

En 2009, Passos da Silva et al ont établi des insectes de *D. opuntiae* sur cinq clones de cactus fourragers cultivés par micropropagation. Les résultats indiquent que seuls deux clones étaient résistants aux insectes cochenilles. Après cela, à ces deux s'ajoutent *Nopalea cochenillifera* Salm Dyck "miuda" et *Opuntia stricta* [Haw.] Haw "Orelha de elefante Mexicana" "miuda". Il est à noter que "miuda" est un cactus mexicain dans lequel les cladodes sont utilisés comme fourrage pour le bétail en raison de leur liberté d'épines (Nerd et al. 1997; Silva et coll. 2018).

Borges et al. (2013a) ont également mené la même étude avec 11 clones de cactus. Outre "miuda" et "Orelha de elefante Mexicana" déjà mentionnés dans l'étude précédente, trois autres clones étaient également résistants aux insectes cochenilles qui sont "Orelha de Elefante Africana", "Orelha de Onça" et "IPA-Sertânia". Encore une fois, toutes ces plantes de cactus sont utilisées comme fourrage.

Récemment au Maroc, la résistance de 248 espèces d'*Opuntia* à *D. opuntiae* a été étudiée à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) pour restreindre l'*Opuntia* dans les zones endommagées et les exploitations agricoles. Ce travail a été réalisé à Sidi Bennour, la région la plus touchée du pays, où 744 cladodes séchés ont été amenés de la ville d'Agadir et plantés sur une parcelle de 1 Ha puis l'évolution a été suivie. En conséquence, seules sept espèces ont résisté contre *D. opuntiae* sous les noms de *Bellara*, *Merjana*, *Ghalia*, *Karama*, *Cherratia*, *Angad* et *Melk Zher* (Sbaghi et al. 2019).

## 3. Lutte biologique

### 3.1. Définition

Depuis des siècles, des efforts considérables ont été consacrés pour développer la méthode de la lutte biologique contre les ravageurs (Hoffmann et al., 1994). Selon Driesche et Bellows (1996), la lutte biologique est un processus agissant au niveau des populations et par lequel la densité de population d'une espèce est abaissée par l'effet d'une autre espèce qui agit par prédation, parasitisme, pathogénicité ou compétition. La lutte biologique ou « le biocontrôle » a été utilisée dans différents domaines de la biologie, notamment l'entomologie et la phytopathologie. En entomologie, il a été utilisé pour décrire l'utilisation d'insectes prédateurs vivants, des nématodes entomopathogènes ou d'agents pathogènes microbiens pour supprimer les populations de différents insectes nuisibles. En phytopathologie, le terme s'applique à l'utilisation d'antagonistes microbiens pour supprimer les espèces phytopathogènes ainsi qu'à

l'utilisation d'agents pathogènes spécifiques à l'hôte pour contrôler les populations de mauvaises herbes (Pal et McSpadden Gardener, 2006).

Dans le cas de la cochenille du figuier de barbarie, cinq types de traitements biologiques ont été utilisés :

### **3.2.Utilisation des extraits des plantes**

Dans le cadre d'utilisation d'extraits botaniques contre *D. opuntiae*, Viguera et al., (2009) ont testé *in vitro* cinq extraits d'espèces de plantes médicinales (*Mentha viridis L.*, *Chenopodium ambrosioides L.*, *Mentha piperita L.*, *Tagetes erecta L.* et *Tagetes florida L.*). Ces extraits ont été tout d'abord mélangés avec 4 émulsifiants (Tween 20, SLS20, PANODAN et CITRIM) pour stabiliser l'émulsion, et ensuite avec de l'eau déminéralisée pour les diluer avant de les appliquer directement sur les cladodes infestés. Les résultats obtenus ont montré que le grand taux mortalité enregistré était entre 82 et 99% pour les larves du deuxième stade en 72 heures en utilisant le mélange des extraits botaniques avec le Tween20. Ce mélange a déshydraté le corps des insectes et a bloqué leurs stigmates ce qui a causé leur mort par asphyxie. Alors que le taux de mortalité observée lorsque les extraits botaniques étaient mélangés avec les autres émulsifiants ne dépassait pas les valeurs 40 et 60 % pour les larves du premier stade et les femelles. Ces mélanges agissent en détruisant la cire protectrice. Par ailleurs, ces auteurs ont démontré que ces extraits botaniques ont modifié les paramètres de reproduction, où le nombre d'œufs pondus par jour a diminué de 30%, et la ponte a été inhibée en utilisant une forte concentration de traitements.

Un autre chercheur, Choi, (2006), a démontré que le D-limonène, un constituant majeur de 95% de l'huile d'écorce d'orange et 75% de l'huile d'écorce d'agrumes, représente un excellent biopesticide. Lors de l'utilisation de ce principe actif sur des insectes *D. opuntiae*, 99 % des femelles et des insectes du premier stade ont été tués après 6 jours. Ce résultat fait du D-limonène un biopesticide prometteur pour lutter contre la cochenille sauvage (Bouharroud et al., 2018).

De plus, *Libidibia ferrea var. ferrea* et *Agave sisalana* ont montré un grand effet insecticide sur *D. opuntiae*. *Libidibia ferrea var. ferrea* est un arbre de la région semi-aride, connu pour son utilisation médicinale, notamment contre le diabète et l'inflammation (Luna et al., 2020). Alors que, *Agave sisalana*, est une plante répandue dans la région nord-est du Brésil, utilisée pour la production de papier et de tapis (Silveira et al., 2012). Lopes et al., (2018) ont extrait les

principaux composés de ces deux plantes et les ont appliqués sur les cladodes du figuier de barbarie infestées. Après 10 jours, l'extrait de *Libidibia ferrea* var. a causé la dégradation de la couche de cire et a tué 97% des femelles et 81% des larves du deuxième stade. Alors que, *Agave sisalana* a tué entre 51 et 97% des femelles.

### **3.3.Utilisation d'extraits végétaux en combinaison avec des extraits microbiens**

La plupart des études ont montré que l'utilisation des extraits de plantes sont plus efficaces lorsqu'ils sont associés à des champignons entomopathogènes (Diniz et al., 2020), comme les espèces *Fusarium*. Ces derniers sont connus par leur efficacité pour attaquer différents insectes tels que les espèces d'homoptères, de coléoptères et d'isoptères. Velez et al., (2019) ont évalué l'efficacité de *Fusarium incarnatum-equiseti* associé à des extraits de *Chenopodium ambrosioides* et d'*Enterolobium contortisiliquum* *in vitro* contre *D. opuntiae*.

Il est à noter que *Chenopodium ambrosioides* est déjà connu pour ses propriétés comme insecticides (Chiasson et al., 2004b, 2004a). Tandis qu'*Enterolobium contortisiliquum* n'a été étudié que pour ses effets antimicrobiens (Shahat et al., 2008).

Dans cette étude, les chercheurs ont infesté les cladodes artificiellement par les cochenilles, qui ont été aspergées de 2 % de détergent neutre pour minimiser la densité de la cire protectrice. Ensuite ils ont pulvérisé les cladodes avec le mélange de *F. incarnatum-equisetian* et aussi avec chacun des extraits des plantes, et les ont maintenues dans des récipients en plastique pendant 10 jours.

En conséquence, le mélange d'extrait aqueux de *Fusarium incarnatum-equiseti* et 10 % d'extrait aqueux de *Chenopodium ambrosioides* a causé une mortalité entre 13,23 et 51,64 %. Alors que, la mortalité la plus élevée a été observée pour le mélange de 5 % d'extrait hydroéthanolique de *Chenopodium ambrosioides* et de *F. incarnatum-equiseti* à l'ordre de 71,92 %. Même l'utilisation d'extrait aqueux de *Chenopodium ambrosioides* seul était efficace. En revanche, aucune mortalité n'a été observée avec *Enterolobium contortisiliquum*.

Cette étude était similaire à celle de da Silva Santos et al., (2016), qui a testé *F. incarnatum-equiseti* avec *Ricinus communis* et *Poincianella pyramidalis*.

*Ricinus communis* est une plante des régions chaudes du monde, connue pour sa valeur traditionnelle et médicinale, elle est utilisée comme agent anti-oxydant, antidiabétique, antimicrobien, mais aussi comme engrais et fongicide (Jena et Gupta, 2012). Par ailleurs, *Poincianella pyramidalis* est une plante endémique de la région semi-aride du Brésil (Santos



dos Reis et al., 2016) connue pour ses usages médicinaux contre la diarrhée, les infections urinaires, la dysenterie et les infections respiratoires (Chaves et al., 2016).

L'application de 5 % d'extrait de *Ricinus communis* a causé la mortalité de 61 % des cochenilles, alors qu'elle atteignait 100 % lorsqu'elle était mélangée avec *F. incarnatum-equiseti*, représentant ainsi le meilleur résultat. Sinon, l'application de 10 % d'extrait aqueux de *Poincianella pyramidalis* a tué 74 % des cochenilles et 80 % lorsqu'il était mélangé au *Fusarium*.

Diniz et al., (2020) ont mené, récemment, une autre enquête en utilisant *F. caatingaense* combiné à des extraits de *Nicotiana tabacum* et *Paubrasilia echinate*.

*Nicotiana tabacum* est une plante originaire d'Amérique, utilisée pour la production de tabac (Al-Lahham et al., 2020). Alors que, *Paubrasilia echinate* est originaire de la côte tropicale d'Amérique du Sud. C'est aussi un arbre célèbre du Brésil commercialisé dans le monde entier pour sa haute qualité de bois (Lichtenberg et al., 2019). Ainsi, pour déterminer leur efficacité dans la lutte contre les cochenilles, leurs extraits ont été combinés à l'extrait de *F. caatingaense* et testés sur les cladodes infestés (Diniz et al., 2020).

La combinaison de *F. caatingaense* avec 10 % d'extrait aqueux de *Nicotiana tabacum* a donné les meilleurs résultats en provoquant la mortalité de 98,7 % des femelles de *D. opuntiae*. Tandis que le mélange de *F. caatingaense* et 20 % de *Paubrasilia echinate* a causé la mortalité que de 48,6 % des insectes.

### **3.4.Utilisation de produits biodégradables**

Borges et al., (2013) ont expérimenté des produits biodégradables (neem, trois concentrations de détergent neutre, huile minérale, manioc et amidon de manioc) sur des cochenilles. Ces auteurs ont mené leurs études en serre '*in vivo*', où ils ont infecté des plants de figuier de barbarie âgés de 6 mois avec 4 femelles de cochenilles matures par plant par des broches entomologiques pour fixer la cire dans les cladodes. Après 45 jours, les figuiers de barbarie sont devenus suffisamment infestés et prêts pour les traitements.

Les résultats ont montré qu'avant les traitements, et après 40 jours d'infestation artificielle, la réduction de la population était estimée à 0,0091 par jour. Alors qu'après l'application de détergent neutre, 98 à 100% de la population de cochenilles était morte dans les zones les plus infestées. Ce détergent a enlevé les filaments cireux et a provoqué le dessèchement du corps des insectes, ce qui a entraîné leur mort. Cela témoigne de l'efficacité de ce détergent dans son effet antiparasitaire.

Alors que, le pourcentage d'efficacité trouvé pour l'huile minérale se situe entre 93 et 97%. L'huile minérale forme un film imperméable autour de la carapace des insectes, provoquant ainsi leur mort par brûlure corporelle et suffocation. Plus intéressant encore, le neem était le meilleur traitement avec un taux de mortalité de 100 % et a également contribué à rajeunir la couleur et l'éclat du cactus *OFI*. Tandis que pour le manioc, même s'il a été rapporté performant contre de nombreux ravageurs dans différentes études, il n'a pas démontré de bons résultats pour lutter contre cette cochenille à carmin.

### **3.5.Utilisation d'ennemis naturels**

De nombreux insectes ont été marqués comme prédateurs des insectes *D. opuntiae*. Vanegas-Rico et al., (2010) ont étudié les ennemis naturels de *D. opuntiae*. Ils ont cité 7 espèces qui sont *Chilocorus cactus*, *Sympherobius angustus*, *Salpingogaster cochenillivorus*, *Laetilia coccidivora*, *Hyperaspis trifurcata*, *Sympherobius barberi* et *Leucopis bellula*. Ces auteurs ont rapporté aussi que *Leucopis bellula*, *Sympherobius barberi* et *Hyperaspis trifurcate* sont trois prédateurs qui consomment des larves au sein des colonies (Pacheco-Rueda et al., 2011 ; Vanegas-Rico et al., 2016).

À cet égard, *Hyperaspis trifurcate* est l'ennemi naturel principal de la cochenille en Amérique du Nord. Il a la capacité de se déplacer facilement d'une colonie à l'autre à la recherche de larves (Cruz-Rodríguez et al., 2016). Ce prédateur termine son cycle de vie lorsque *D. opuntiae* est dans son premier stade, ce qui en fait un candidat potentiel comme agent de lutte biologique contre les cochenilles (Vanegas-Rico et al., 2016).

Même chose avec *Sympherobius barberi*, une chrysope brune caractérisée par la grande mobilité entre les colonies, néanmoins l'acide carminique de la cochenille peut l'empoisonner (Pacheco-Rueda et al., 2011). En revanche, les insectes *Laetilia coccidivora* ne sont pas affectés par l'acide carminique, ils dégorgent rapidement les cochenilles femelles (Eisner et al., 1994). Même Mendel et al., (2020) confirment que *Laetilia coccidivora* et *Hyperaspis trifurcate* sont les plus puissants prédateurs de la cochenille sauvage.

*Chilocorus cacti* est connu au Mexique par sa production du colorant et la consommation de cochenilles femelles (Badii et Flores, 2001). Pour cela, Flores et al., (2013) a étudié sa réponse fonctionnelle sur *D. opuntiae*. Des insectes *Chilocorus cacti* adultes ont été collectés sur des cactus au Mexique et stockés pendant 72 heures, puis placés dans des cladodes qui ont été affectés par des femelles de *D. opuntiae*. Les résultats montrent que les *Chilocorus cacti* consomment efficacement les femelles après avoir passé beaucoup de temps à retirer leurs

filaments cireux protecteurs. Ils ne peuvent donc pas être utilisés comme lutte biologique en raison de leur cycle de vie court par rapport au cycle de vie de *D. opuntiae*. En revanche, les *Chilocorus cacti* peuvent être utilisés comme contrôle préventif.

Au sein de cette ligne, il y a l'insecte australien, *Cryptolaemus montrouzieri mulsant*, un ennemi naturel de *D. opuntiae* caractérisé par un cycle de vie court à haute température et peut survivre à une température de 10°C (Babu et Azam, 1987). Aussi, Bouharroud et al., (2018) a expérimenté pour la première fois au Maroc l'efficacité de cet insecte sur *D. opuntiae*. Le taux de réduction de *D. opuntiae* dépassait 92 % après 77 jours. Mais les cladodes ont fini par mourir en raison de la forte densité de cochenille sauvage dans les cladodes.

### **3.6.Utilisation d'extraits microbiens**

*Bacillus subtilis* est une bactérie très connue pour ses effets insecticides en agriculture. En effet, Idris et al., (2019) ont analysé l'efficacité d'une solution enzymatique brute de micro-organismes sur *D. opuntiae*. D'après les résultats obtenus, à la concentration de 35 %, l'extrait enzymatique brut a tué 50 % des femelles adultes et 98 % des larves. Alors qu'à 100 %, il tuait environ 90 % des femelles adultes et 100 % des larves. De plus, cet extrait enzymatique brut a été démontré efficace pour dégrader la couverture cireuse.

**Chapitre II : Isolement et  
identification des bactéries isolées de  
la rhizosphère du cactus (*Opuntia  
ficus indica*) à pouvoir insecticide vis-  
à-vis la cochenille (*Dactylopius  
opuntiae*)**

## **A. Introduction**

La lutte biologique à l'aide des bactéries antagonistes est une approche intéressante pour réduire l'application d'insecticides de synthèse tout en ayant un faible impact sur l'environnement. Alors que jusqu'à actuellement, les chercheurs n'ont pas étudié en profondeur l'effet biocontrôle des souches bactériennes sur *D. opuntiae*. C'est dans ce cadre que s'inscrit la thématique de ce travail qui vise à développer des stratégies de lutte contre *D. opuntiae* en utilisant des bactéries bénéfiques au lieu d'insecticides organophosphorés. Afin d'atteindre ce but, l'étude consiste à évaluer l'activité bio-insecticide de cinq souches de bacilles en tant qu'agents de lutte biologique contre *D. opuntia* et ceci d'abord dans les conditions de laboratoire. Par la suite, nous allons vérifier leur potentiel pour décomposer les filaments cireux qui protègent les insectes et ceci à travers des expériences réalisées dans la serre. Ensuite, les isolats montrant un bon effet insecticide seront étudiés pour leur habilité à solubiliser les minéraux et à produire des enzymes stimulant la croissance des plantes.

## **B. Matériel et méthodes**

### **I. Isolement des bactéries de la rhizosphère du cactus**

A partir de la rhizosphère du cactus, des bactéries ont été isolées. Tout d'abord, les racines du cactus ont été retirées et mises en suspension dans une solution stérile de 0,85 g de NaCl dans 100 ml d'eau distillée. Par la suite, les racines ont été extraites des suspensions et lavées à l'eau du robinet pour éliminer les particules du sol collées. Les racines ont ensuite été broyées dans 90 ml d'eau distillée à l'aide d'un mortier et un pilon. Ensuite, plusieurs dilutions ont été réalisées et des volumes de 100 µl de solutions aliquotes ( $10^5$ ,  $10^6$  et  $10^7$ ) ont été étalés sur le milieu gélosé Luria Bertani (LB) (pH=7). Après deux jours d'incubation à  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , les colonies apparues ont été isolées et purifiées sur milieu solide gélose LB jusqu'à l'apparition des colonies pures. Au total, 62 isolats ont été purifiés.

### **II. Criblage des isolats bactériens à pouvoir insecticide vis-à-vis la cochenille *Dactylopius opuntiae***

Les 62 isolats ont été testés pour leur potentiel de lutte biologique contre les larves et les femelles adultes de *D. opuntiae*. Ainsi ce criblage a été basé sur la pulvérisation des suspensions bactériennes des isolats sur des cladodes infectées. Par conséquent, cinq isolats ont montré un effet insecticide et ont été sélectionnés, par la suite, pour une analyse plus approfondie.

### **III. Confirmation du pouvoir insecticide vis-à-vis la cochenille**

#### **1. Collecte de cladodes sains et de cladodes infecté**

Les cladodes ont été récoltés dans un champ du cactus de la région de Béni Mellal, située à 32°22'30"N 6°19'27"O. Nous avons réalisé la collecte en même temps des cladodes sains et ceux en phase d'une infection sévère afin d'isoler facilement les femelles et les larves.

#### **2. Pouvoir insecticide des isolats bactériens *in vitro***

Les cinq isolats bactériens ont été préparés dans une solution pour réaliser une suspension mère, à partir de laquelle des dilutions ont été effectuées. Six concentrations différentes de  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ , et  $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup> ont été utilisées pour tester l'effet antagoniste des isolats bactériens sur les femelles adultes et les nymphes de *D. opuntiae*. L'eau distillée a été utilisée comme témoin. Après cela, les cladodes de cactus ont été coupés en morceaux de 70/70 mm, ensuite stérilisés avec de l'hypochlorite de sodium à 5 % et séchés à température ambiante (25°C) après un lavage trois fois avec de l'eau distillée. Ces morceaux ont été immergés dans des solutions de différentes concentrations bactériennes pendant 10 secondes et séchés pendant 1 h. Dans chaque morceau du cladode traité, 20 femelles et larves ont été placées. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque traitement. Après 48 heures d'exposition aux solutions bactériennes, les insectes morts ont été comptés.

#### **3. Pouvoir insecticide des isolats bactériens *in vivo***

L'essai du biocontrôle a été réalisé dans la serre de la faculté des sciences et techniques de Béni Mellal (Maroc) en Juin 2021. Dans cette expérience, seules les femelles ont été utilisées pour tester la capacité des souches bactériennes à détruire la cire protectrice et à éradiquer les cochenilles femelles. L'infestation a été réalisée de manière aléatoire par diffusion aérienne d'insectes provenant de cladodes infestés. Après 40 jours d'infestation provoquée, les femelles se sont recouvertes de cire hydrophobe. Ensuite, nous avons réalisé la pulvérisation des cladodes du cactus par les solutions de quatre isolats (Bm1A, Bm3C, Bm4D et BME8n), et ceci tous les trois jours pendant 15 jours. Comme témoins positifs et négatifs, l'insecticide organophosphoré chlorpyrifos-éthyl (DURACID EC) et l'eau ont été utilisés. Des dilutions de solutions bactériennes ont été préparées le jour de la pulvérisation ( $10^6$  CFU.mL<sup>-1</sup> et  $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>). Trois répétitions ont été réalisées pour chaque traitement, et le nombre de femelles mortes a été compté après 7 jours d'exposition aux traitements.

## **IV. Identification des isolats bactériens à pouvoir insecticide**

### **1. Identification macroscopique**

Les isolats ont été striés à l'aide d'une anse calibrée de 10 µl par tries serrées sur le milieu de culture LB, ensuite les boîtesensemencées ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. Ainsi, l'identification macroscopique a été faite par observation des colonies des isolats sur boîte de Pétri à l'œil nu afin de déterminer la forme, la taille, le relief, la couleur et l'aspect des colonies.

### **2. Identification microscopique**

L'identification microscopique a été effectuée par la coloration de Gram.

Des cultures de 10 ml des souches d'intérêt sont incubées à 28°C, sous agitation pendant 24 Heures. La coloration de Gram s'effectue en deux étapes selon le protocole suivant :

- Réalisation du frottis : Elle nécessite d'avoir un frottis fixé à la flamme selon les indications suivantes :
  - Déposer sur une lame un aliquote de 2 µl d'une culture bactérienne.
  - Étaler et fixer à la chaleur.
- Réalisation de la coloration : Elle comporte les différentes étapes suivantes :
  - Colorer au cristal violet pendant 1 minute ;
  - Laver à l'eau ;
  - Couvrir le frottis de lugol et laisser agir 1 minute ;
  - Laver à l'eau ;
  - Décolorer à l'alcool 95% durant 10 à 20 secondes ;
  - Laver à l'eau ;
  - Colorer à la fuchsine pendant 1 minute ;
  - Rincer doucement à l'eau et sécher la lame ;
  - Laisser sécher la lame pendant 10 à 15 minutes.

L'observation microscopique permet de distinguer les bactéries à Gram positif colorées en violet, de celles à Gram négatif colorées en rose.

### **3. Tests biochimiques**

#### **3.1 Activité d'amylase**

Pour déterminer la première activité celle de l'activité amylique des isolats, une suspension de culture bactérienne jeune prélevée par une anse a été inoculée sur une boîte de gélose à l'amidon

(Annexe 1). Après 48 h d'incubation à 28 °C, la zone claire autour de la culture bactérienne détermine la production de l'enzyme  $\alpha$ -amylase (Cappuccino et Sherman, 1992).

### **3.2 Recherche de la cellulase**

Pour déterminer la production de cellulase, le milieu a été préparé en ajoutant 1 % de cellulose dans un milieu de base (Annexe 1). Une suspension de culture bactérienne jeune prélevée par une anse a été inoculée sur le milieu et incubée pendant 5 jours. Le milieu cellulosique a été inondé avec une solution de rouge congo à 0,01% pendant 15 min et les boîtes ont été décolorées avec une solution de NaCl à 1% pendant 5 min. Une zone dégagée contre le dos rouge détermine la production de l'enzyme cellulase (Cappuccino et Sherman, 1992).

### **3.3 Mise en évidence de la production de la protéase**

Pour déterminer la production d'enzymes protéases, une boucle de la suspension de cellules bactériennes a été striée sur une plaque de gélose au lait (Annexe 1). Après 48 h d'incubation à 28 °C, la zone claire autour de la culture bactérienne détermine la production de protéases (Cappuccino et Sherman, 1992).

### **3.4 Production de la pectinase**

Pour déterminer la production de pectinase, le milieu a été préparé en ajoutant 1 % de la pectine dans un milieu de base (Annexe 1). Une suspension de culture bactérienne jeune prélevée par une anse a été inoculée sur le milieu et incubée pendant 5 jours. La solution d'iode a été ajoutée à la gélose à la pectine et l'observation de la zone d'halo claire sur le fond bleu foncé est considérée comme résultat positif (Cappuccino et Sherman, 1992).

### **3.5 Production de la chitinase**

L'activité de la chitinase a été testée par la méthode décrite par Kaur et al. (2012). Les colonies bactériennes uniques ont été criblées sur un milieu sélectif utilisé par Kaur et al., 2012 (Annexe 1) et cultivées pendant deux jours à 30°C. La formation du halo autour des colonies est une confirmation de la dégradation de la chitine.

### **3.6 Production de la lipase**

Pour la production de lipase, les organismes lipolytiques ont été criblés par un test qualitatif sur plaque utilisé par Thongpoon (2021). Les isolats ont été cultivés sur des plaques de base



de gélose à la tributyrine et incubés à 36°C pendant deux jours. Une zone de clairance a été observée en raison de l'hydrolyse de la tributyrine.

### **3.7 Tolérance à différentes températures**

Les tests ont été réalisés sur des boîtes en milieu solide de l'Extrait de Levure Mannitol (YEM) (Annexe 1) inoculées avec une pré-culture bactérienne puis incubées à 28 °C pendant 7 jours. Pour tester la tolérance à différentes températures, les boîtes inoculées ont été incubées à 28, 35, 45 et 50 °C (Kaur et al. 2012).

### **3.8 Tolérance à différentes concentrations de NaCl**

Pour examiner la tolérance au pH, le milieu solide YEM a été ajusté aux valeurs de 5, 7, 9 et 11 en utilisant une solution de NaOH (40%) et HCl (37.2%) (Haouas et al. 2021).

### **3.9 Tolérance au pH**

Pour étudier la tolérance au NaCl, les milieux ont été préparés en utilisant des concentrations de NaCl de 2, 4, 6, 8, 10 et 12 % (Haouas et al. 2021).

### **3.10 Test de polyéthylène glycol 6000 (PEG 6000)**

Le stress hydrique a été vérifié à des concentrations de polyéthylène glycol 6000 (PEG 6000) de 5, 10, 15, 20 et 25% dans des tubes à essai de YEM liquide (Haouas et al. 2021).

## **4. Identification moléculaire**

### **4.1. Extraction de l'ADN**

Les ADN totaux des isolats bactériens ont été extraits par la méthode du phénol-chloroforme à partir d'une culture bactérienne à croissance exponentielle décrite par Haouas et al. (2021). Les cellules ont été mises en suspension dans le tampon de lyse après centrifugation à 13 000 rpm pendant 5 minutes. La solution a ensuite été traitée avec 100 ml de NaCl 5 M avant d'être centrifugée à 13 000 tr/min pendant 10 minutes à 4 °C. Le surnageant de la solution a été ensuite traité avec un volume égal de phénol-chloroforme : alcool isoamylique (25 : 24 : 1, v/v). L'ADN a été précipité dans l'éthanol absolu, lavé deux fois dans de l'éthanol à 70 %, séché et redissous dans l'eau pure stérile. Un spectrophotomètre NanoDrop™ a été utilisé pour déterminer la concentration et la pureté de l'ADN. L'ADN a été dilué à une concentration standard de 100 µl et stocké à 20 °C pendant 24 h.

#### **4.2. Amplification de l'ARNr 16S**

Les séquences presque complètes du gène de l'ARNr 16S des isolats ont été amplifiées à l'aide de deux amorces universelles rD1/fD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3')/(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Bouhnik et al. 2019). Dans un volume réactionnel de 25 µl, un mélange a été composé de 1 µl d'ADN extrait, 1 ml de chaque matrice à 10 µM, 9,5 µl d'eau pure stérile et 12,5 µl de MytTaq<sup>TM</sup>Mix, 2x (BIOLINE) prêt à l'emploi contenant l'enzyme Taq polymérase, le tampon de réaction, le MgCl<sub>2</sub> et les dNTPs. Le programme d'amplification par PCR a été exécuté selon les étapes suivantes : une pré dénaturation à 95 °C pendant 1 min, puis durant 30 cycles, une dénaturation à 95 °C pendant 15 secondes, une hybridation à 58 °C pendant 15 secondes et une élongation à 72 °C pendant 10 secondes. À l'issue des cycles, une extension finale a été effectuée à 72 °C pendant 1 min. Une électrophorèse horizontale sur un gel d'agarose à 1 % contenant 0,5 µg.mL<sup>-1</sup> de bromure d'éthidium dans un tampon TAE 1X a été utilisée pour vérifier l'amplification des fragments d'ADN. Le 1 Kb (HyperLadder, BIOLINE TM) a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire lors de chaque migration. Un transilluminateur UV a été utilisé pour visualiser la migration des bandes.

#### **4.3. Séquençage**

Le système de purification de produits PCR Qiagen a été utilisé pour purifier les produits d'amplification d'ARNr 16S. Le séquençage a été réalisé sur un séquenceur ABI 3130 XL Applied Biosystems (Centre National de la Recherche Scientifique et Technique, Maroc).

#### **4.4. Analyse bio-informatique**

Dans un premier temps, les séquences nucléotidiques générées ont été comparées aux souches de type bactérien fournies par la base de données GENBANK (disponible sur [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) du National Center for Biotechnology Information (NCBI) à l'aide du logiciel BLASTN (Altschul et al. 1990). Ensuite, les séquences nucléotidiques ont été manuellement alignées, vérifiées et corrigées à l'aide de Chromas 2 (version 2.6.5) et MEGA 7 (version 7.0.26). Enfin, une analyse phylogénétique a été réalisée à l'aide de la méthode de jonction de voisins (Saitou et Nei 1987) et du modèle Kimura à 2 paramètres (Kimura 1980) dans MEGA 7.0 avec 1000 répliquats bootstrap. Les numéros d'accès des séquences nucléotidiques des bactéries utilisées dans cette étude sont présentés dans le tableau VII.

#### **4.5. Analyse statistique**

Les expériences ont été réalisées en triple. Les données ont été analysées en utilisant l'analyse de variance (ANOVA), et la comparaison de toutes les paires de moyennes a été effectuée avec le test posthoc Tukey HSD. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec SPSS version 25.

### **V. Attribut de la promotion de la croissance des plantes par les souches sélectionnées**

#### **1. Fixation d'azote**

La fixation du N<sub>2</sub> a été déterminée par l'observation de la croissance des souches bactériennes dans le milieu solide de Burk (Annexe 1) sans N<sub>2</sub> (Castellano Hinojosa et Bedmar 2017).

#### **2. Solubilisation de phosphate**

La solubilisation du P a été testée en utilisant le milieu gélosé de Pikovskaya (PVK) (Annexe 1). Une boucle pleine de la culture bactérienne de bouillon de 24 h a été inoculée sur la boîte de culture Pikovskaya. Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 96 h, et ont été observées pour la zone de dégagement autour de la colonie bactérienne, ce qui indiquait la solubilisation du P. La zone de solubilisation a été déterminée en calculant l'indice de solubilisation (IS) selon l'équation suivante rapporté par Premono et al. (1996) :

$$\text{Indice de solubilisation (IS)} = (D_c - D_h) / D_c$$

D<sub>c</sub> est le diamètre de la colonie ; D<sub>h</sub> est le diamètre de la zone du halo.

#### **3. Solubilisation de zinc**

La solubilisation du Zn a été déterminée dans un milieu de gélose aux sels minéraux (Annexe 1) modifié avec 0,1% d'oxyde de zinc insoluble (ZnO). Une boucle pleine de la culture bactérienne de bouillon de 24 h a été inoculée sur le milieu, incubée à 28 °C. La zone de solubilisation ou zone claire autour des colonies a été mesurée 48 heures après l'inoculation (Venkatakrisnan et al. 2003).

#### **4. Solubilisation de potassium**

Pour déterminer la solubilisation du K, les cultures ont été inoculées sur du milieu Aleksandrov contenant du mica (Annexe 1) (Hu et al. 2006). Les boîtes ont été incubées à température ambiante ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ) pendant 3 jours, ensuite, la zone de solubilisation a été mesurée.

#### **5. Production de l'acide indole acétique (AIA)**

Les bactéries ont été testées pour leur capacité à produire de l'AIA par la méthode de Sawar et Kremer (1995). Chaque souche bactérienne a été inoculée en ajoutant 50  $\mu\text{L}$  de suspension cellulaire dans 5 mL du bouillon d'extrait de levure tryptone/peptone stérile (Annexe 1) dans des tubes de culture de 15 mL qui sont incubés pendant 72 H à  $28^\circ\text{C}$  dans l'obscurité. Par la suite, 1,5 mL de ce bouillon a été centrifugé à 13 000 tours pendant 10 min. A 1 mL du surnageant, 1 mL de réactif de Salkawaski a été ajouté (Annexe 1). Les tubes sont ensuite incubés à  $37^\circ\text{C}$  dans l'obscurité pour 1 H. La formation d'une couleur rouge dans le milieu indique la production d'IAA par la bactérie.

#### **6. Production des sidérophores**

Les bactéries sélectionnées ont été testées pour la production de sidérophores sur du milieu chrome azurol S (CAS) (Annexe 1). Ce milieu a étéensemencé par une des souches bactériennes en utilisant la méthode spot puis incubé à  $28^\circ\text{C}$  pendant 48h. La production de sidérophores a été évaluée par l'apparition d'un halo jaune autour de la colonie (Louden et al. 2011).

## **C. Résultats et discussion**

### **I. Isolement et criblage des bactéries de la rhizosphère du cactus à pouvoir insecticide vis-à-vis la cochenille *Dactylopius opuntiae***

L'observation des bactéries associées au rhizosphère du cactus montre qu'il existe une biodiversité bactérienne intéressante qui peut jouer un rôle très important dans la résistance de cette plante à différents stress (climatiques et/ou terreaux) où elle se développe.

Ainsi, parmi les soixante-deux bactéries qui ont été isolées, cinq isolats, nommés Bm1A, Bm2B, Bm3C, Bm4D et BME8, ont été sélectionnés pour leur activité insecticide contre les cochenilles.

### **II. Confirmation du pouvoir insecticide vis-à-vis la cochenille**

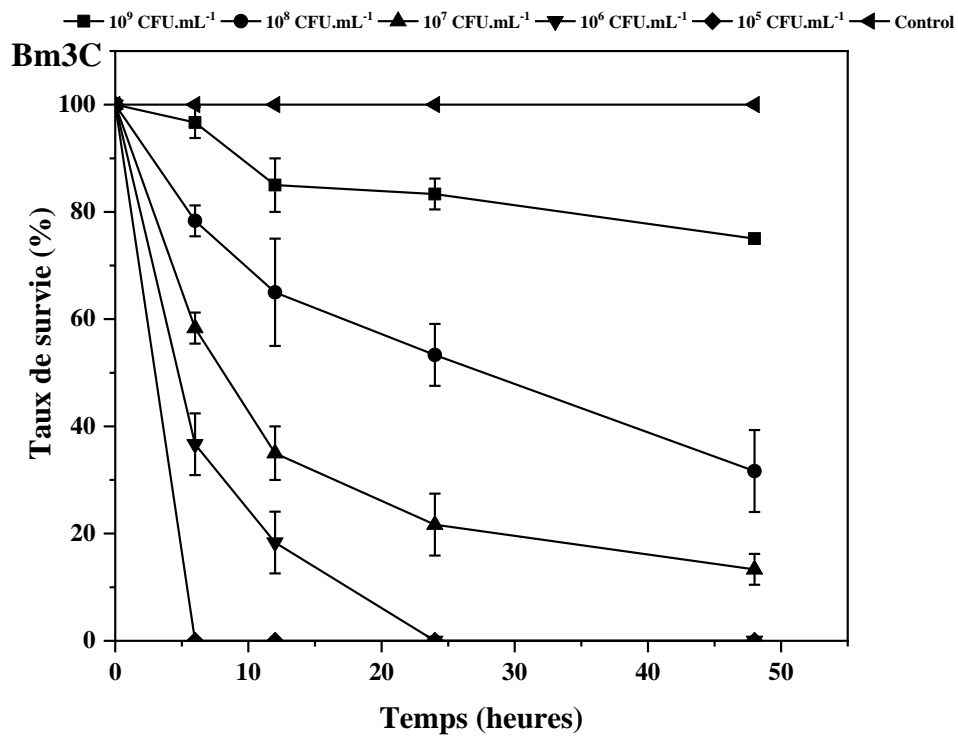
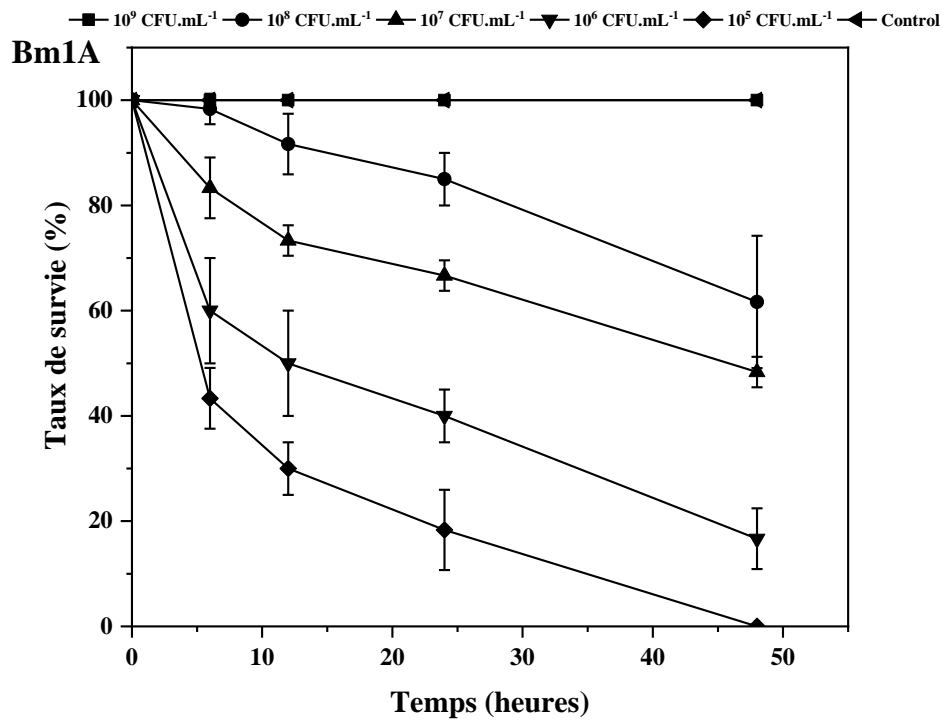
#### **1. Pouvoir insecticide des isolats bactériens *in vitro***

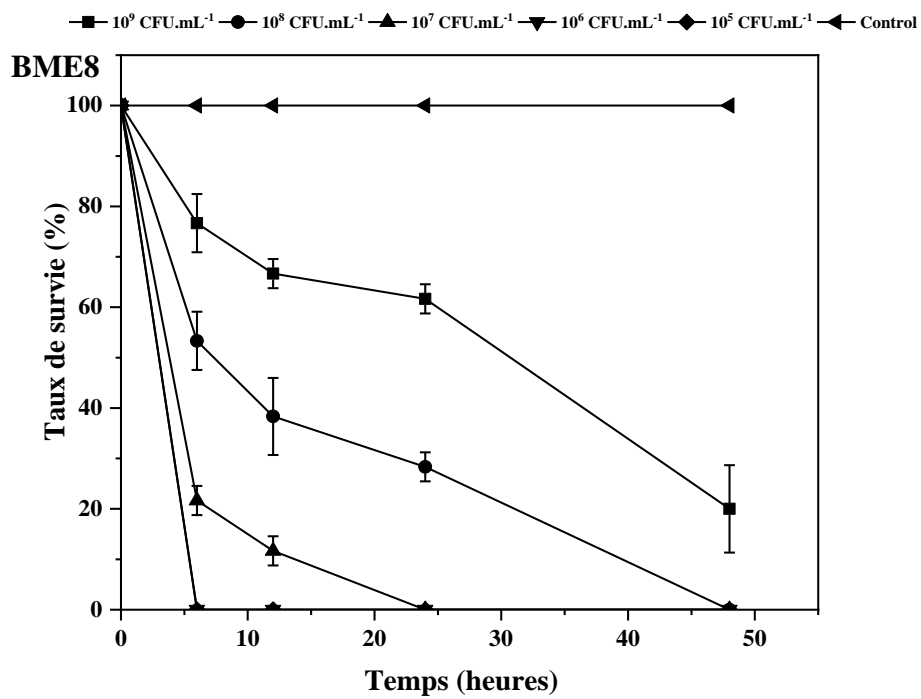
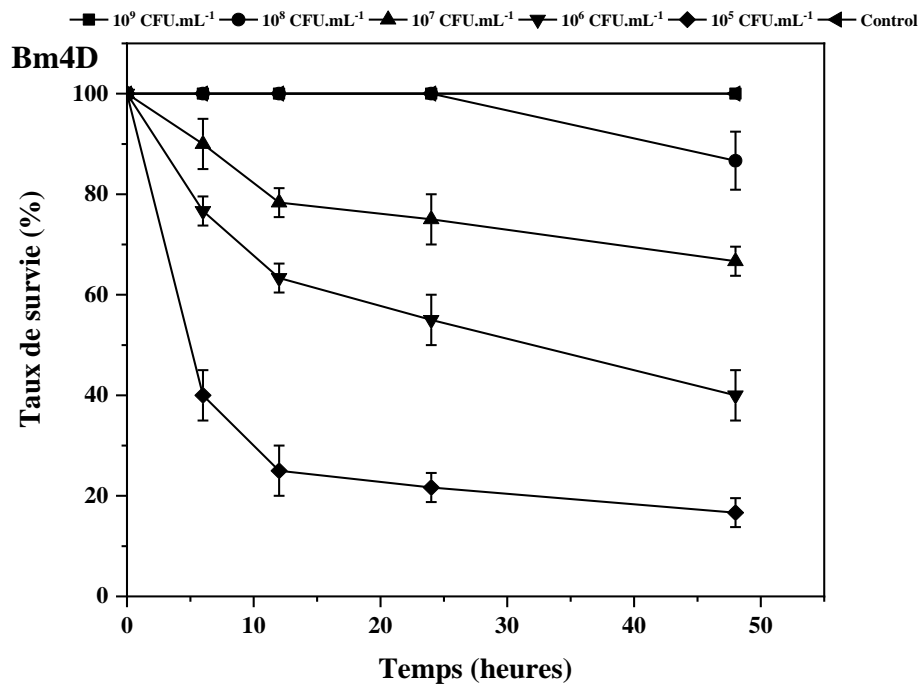
##### **1.1 Pouvoir insecticide des isolats bactériens vis-à-vis les femelles de la cochenille**

Le taux de survie des larves de *D. opuntiae* exposées aux quatre isolats bactériens est présenté dans la figure 5. De manière générale, au fur et à mesure que la durée et la concentration de chaque traitement augmentent, le taux de survie diminue.

Pour plus de détail, le traitement avec l'isolat BME8 à  $10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup> et l'isolat Bm3C à  $10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup> a entraîné la mortalité la plus élevée chez les femelles de *D. opuntiae*. En fait, le taux de survie a passé de 100% à 0% après 6 heures du traitement. À la même concentration ( $10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>), l'isolat Bm1A a mis jusqu'à 48 heures pour tuer toutes les femelles testées. L'isolat Bm4D a tué 73% de la population féminine en 48 heures à une dose de  $10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>.

Par ailleurs, pendant les 24 premières heures qui suivent l'application des isolats bactériens, les femelles deviennent lisses et les traces des filaments cireux disparaissent. De plus, lors de l'application de l'isolat BME8, un petit gonflement a été remarqué. Néanmoins, après 48 heures, les corps des femelles ont rétréci et la couleur est devenue sombre au noir pour les insectes morts. Tandis que l'isolat Bm2B n'a montré aucun effet insecticide vis-à-vis aux femelles.



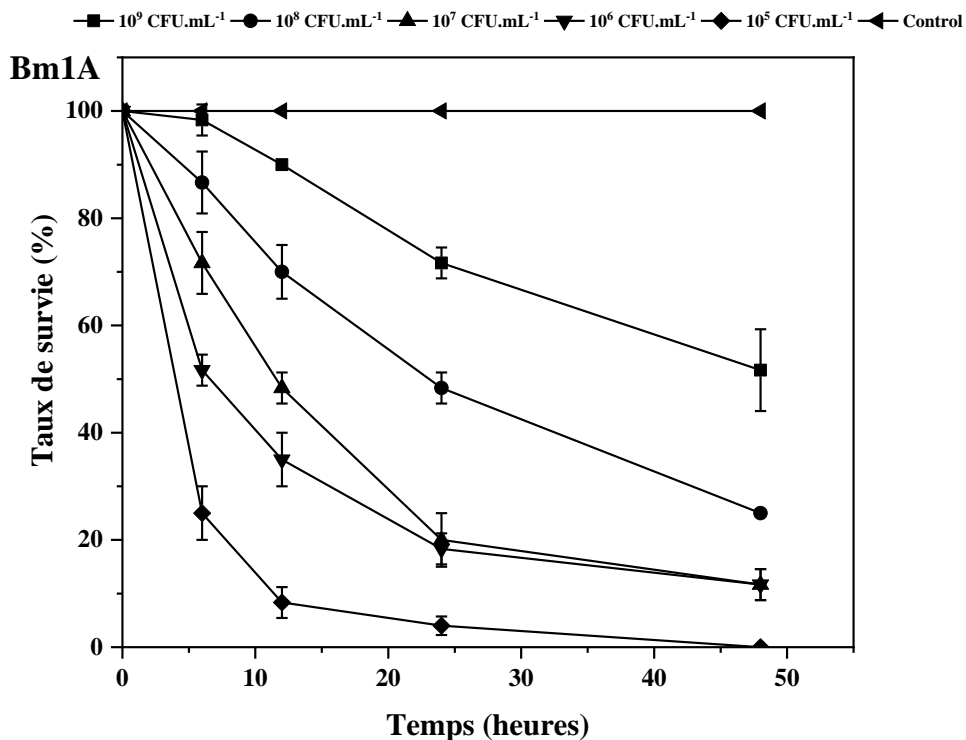


**Figure 5** : Taux de survie des femelles adultes de *D. opuntiae* exposées à cinq concentrations des quatre isolats Bm1A, Bm3C, Bm4D et BME8

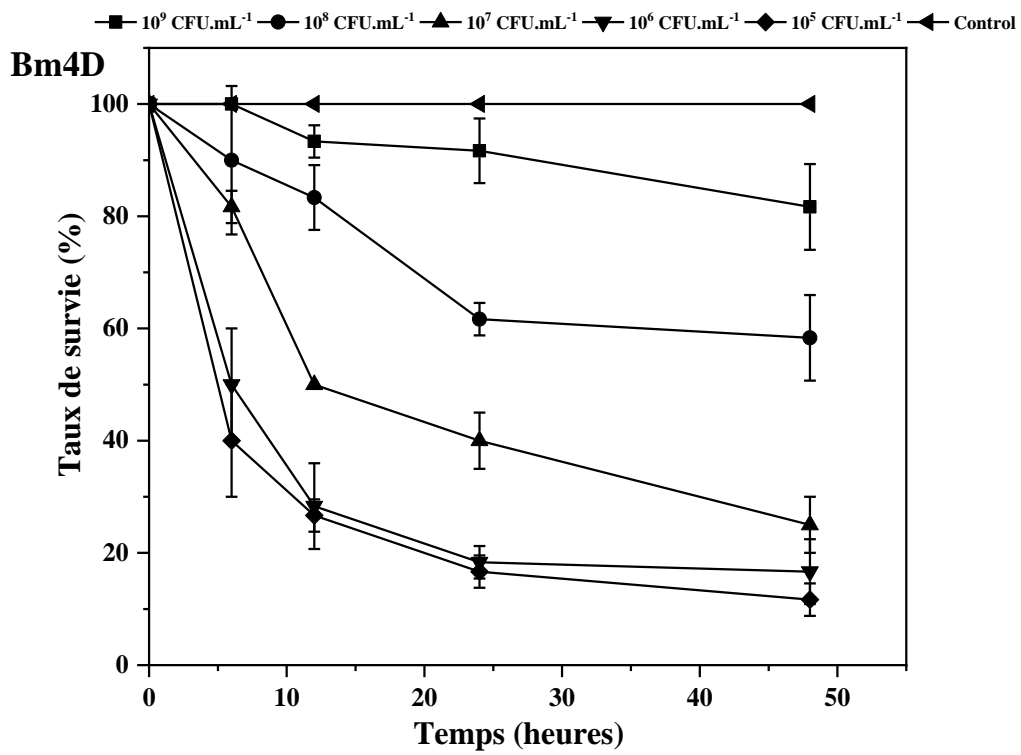
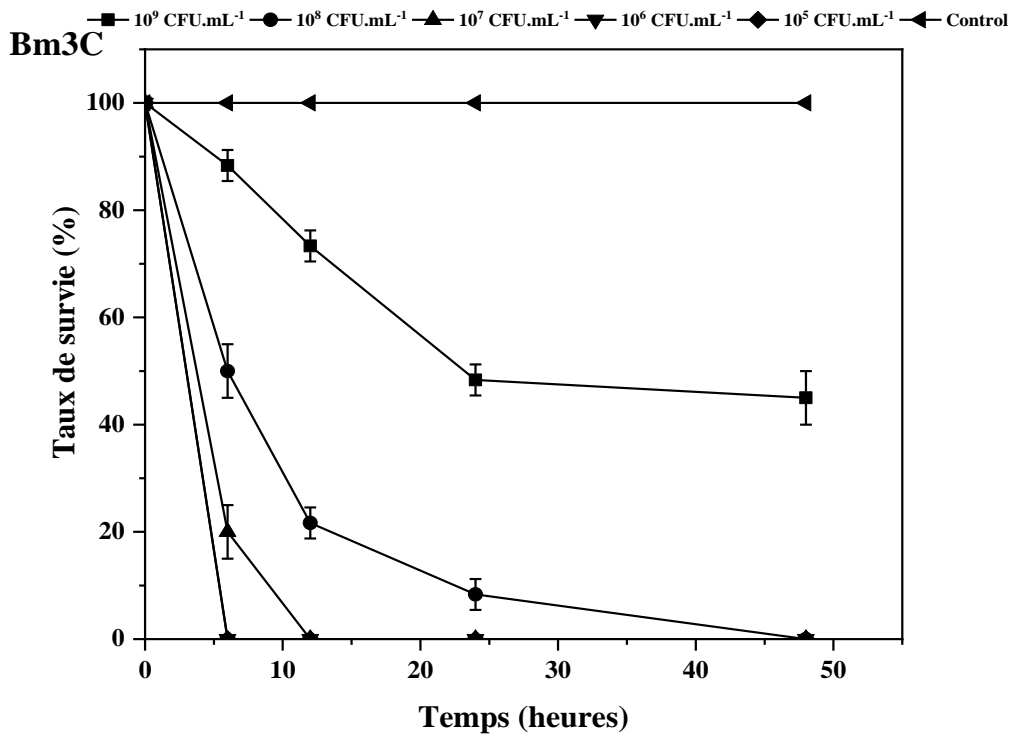
## 1.2 Pouvoir insecticide des isolats bactériens vis-à-vis aux larves des cochenilles

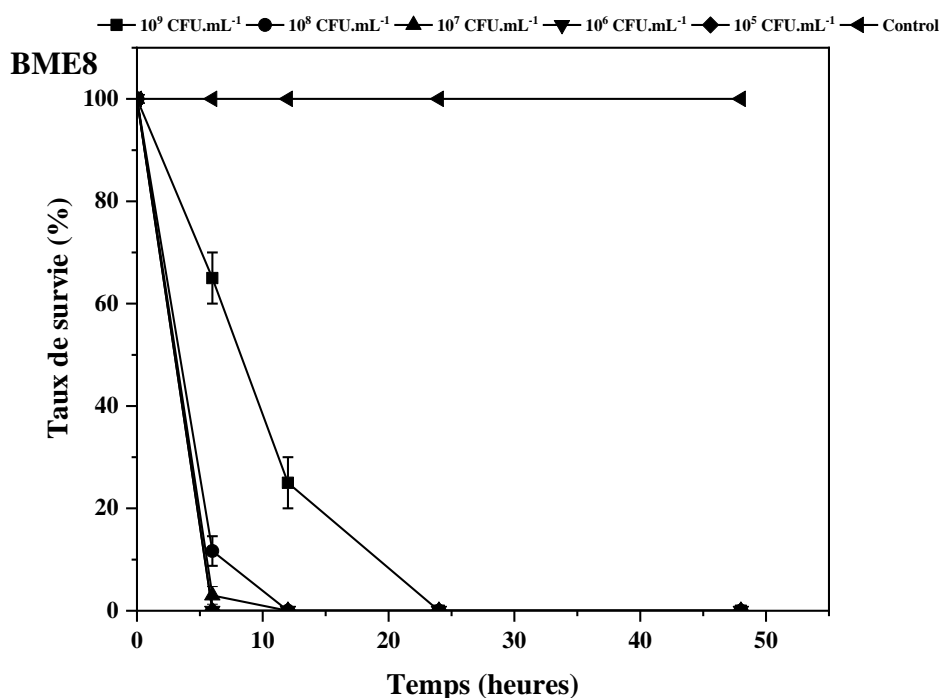
Le taux de survie des larves de *D. opuntiae* exposées aux quatre souches bactériennes est présenté dans la figure 6. Les larves étaient plus sensibles aux traitements que les femelles (figure 5). En effet, à  $10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup> de l'isolat BME8 étaient suffisants pour tuer toutes les larves après 24 heures. À  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> l'isolat Bm3c a réduit le taux de survie à 3,3% en 48 heures et à 0% après 12 heures avec  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>. L'isolat Bm1A a également été efficace, marquant un taux de survie de 51% à  $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup> et 0% à  $10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup> en 48 heures. D'autre part, le taux de mortalité le plus faible pour l'isolat Bm4D, 8,3%, est survenu après 48 heures à  $10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>.

Il est à notifier qu'avant d'appliquer les quatre traitements, les larves de *D. opuntiae* étaient très mobiles et bougeaient leurs pattes. Cependant, lors de l'application des isolats, elles ont commencé à trembler, en particulier lors de l'application des isolats BME8 et Bm1A. Après 12 heures, les larves ont rétréci et sont devenues sombres, et aucune mobilité n'a été observée. Comme chez les femelles, l'isolat Bm2B n'a montré aucun effet insecticide vis-à-vis aux larves.







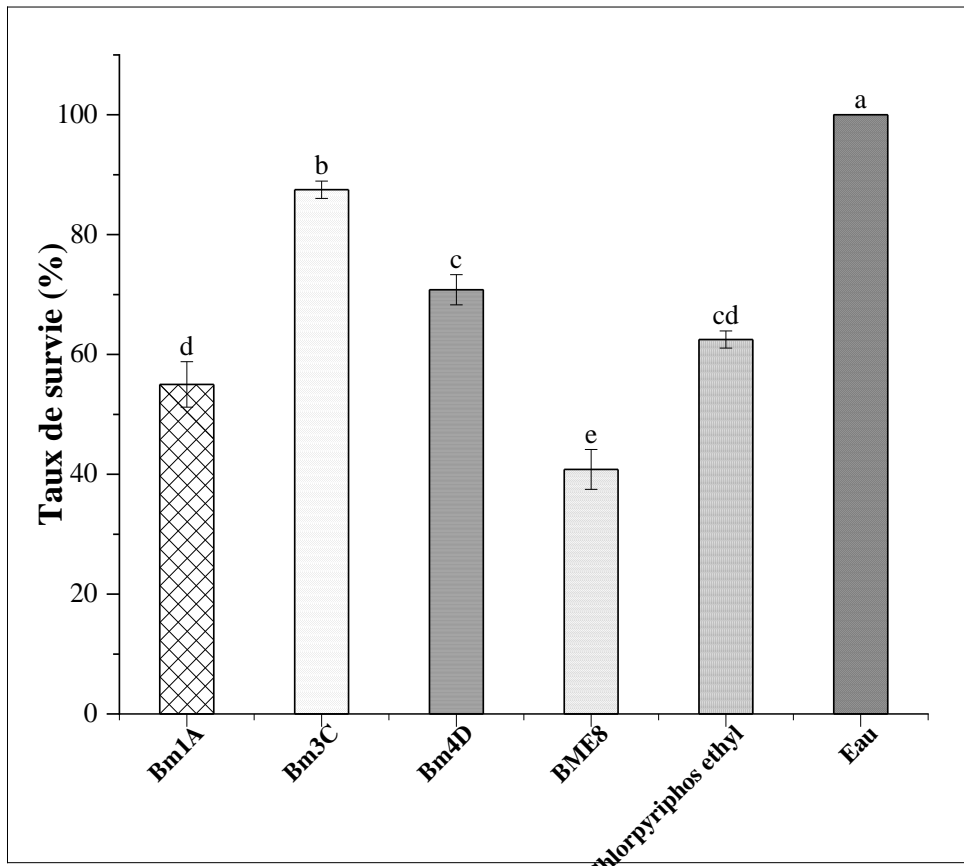


**Figure 6** : Taux de survie des larves de *D. opuntiae* exposées à cinq concentrations des quatre isolats Bm1A, Bm3C, Bm4D et BME8.

## 2. Pouvoir insecticide des isolats bactériens *in vivo*

### 2.1 Pouvoir insecticide des isolats bactériens vis-à-vis les cochenilles femelles

Le traitement phytosanitaire a été réalisé pour tester l'efficacité des quatre isolats bactériens *in vivo* à éliminer les femelles couvertes par la cire et aussi leur pouvoir de biodégradation de cette cire protectrice à l'insecte. La figure 7 montre l'évolution du taux de survie des femelles après 15 jours d'application de différents traitements. Le BME8 a causé la mortalité la plus élevée à  $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>, où le taux de survie a diminué à 40,82 %. Suivi par Bm1A diminuant les survivants à 55% avec l'observation de la dégradation de la couverture cireuse. Alors que pour Bm3C, malgré sa grande efficacité sur les femelles en conditions du laboratoire, l'isolat a montré, néanmoins, une faible efficacité en serre, chose qui peut probablement être expliquée par le fait que le revêtement cireux des insectes a empêché la pénétration de l'isolat chez les femelles. En revanche, Bm4D a dégradé les filaments cireux après quelques minutes de son application, mais n'a abouti qu'à une réduction de la survie de la population féminine à un taux de 70,8%.



**Figure 7 :** Taux de survie des femelles adultes de *D. opuntiae* après 7 jours d'application des différents traitements : Bm1A, Bm3C, Bm4D, BME 8, Chlorpyrifos-éthyl et eau.

### III. Identification des isolats bactériens à pouvoir insecticide

#### 1. Identification macroscopique et microscopique

Les résultats de l'étude morphologique macroscopique et microscopique des isolats sont montrés dans le tableau IV. En fait, lorsqu'elle est cultivée sur gélose LB, la colonie de l'isolat Bm1A est de morphologie circulaire, rugueuse, opaque, blanche floue avec des bords déchiquetés et sous microscope, l'isolat est sous forme de bâtonnet à Gram positif. En revanche, Bm2B est un bacille à Gram négatif mésophile aérobie pigmenté en jaune non entérique. Quant à Bm3C est une bactérie formée de bacille à Gram positif et présente une couleur blanche floue, non mobile et forme des spores. Tandis que la bactérie Bm4D est un Gram positif, mobile et produit des spores. Finalement, BME8 est une bactérie aérobie à Gram positif formant des spores.

**Tableau IV** : Propriétés macroscopiques et microscopiques des isolats bactériens

| Propriétés  | Bm1A                 | Bm2B                     | Bm3C             | Bm4D             | BME8             |
|-------------|----------------------|--------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Gram        | Gram +               | Gram -                   | Gram +           | Gram +           | Gram +           |
| Forme       | Bacille              | Bacille                  | Bacille          | Bacille          | Bacille          |
| Couleur     | Blanche floue        | Jaune                    | Blanche floue    | Blanche floue    | Blanche floue    |
| Motilité    | Mobile               | Non-mobile               | Non-mobile       | Mobile           | Mobile           |
| Sporulation | Forme des endospores | Sans formation de spores | Forme des spores | Forme des spores | Forme des spores |

#### 2. Tests biochimiques

##### 2.1. Production de l' $\alpha$ -amylase, protéase, cellulase, pectinae, chitinase et lipase

L' $\alpha$ -amylase est une enzyme hydrolase qui catalyse l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1, 4-glycosidiques internes dans l'amidon pour donner des produits comme le glucose et le maltose. C'est une métalloenzyme calcique, c'est-à-dire qu'elle dépend de la présence d'un co-facteur métallique pour son activité (Sundarram et Murthy, 2014). D'après les résultats de la présente étude, il s'est avéré que tous les isolats produisent l' $\alpha$ -amylase (tableau V et figure 8).

Les enzymes protéolytiques, également appelées protéases, sont les enzymes qui catalysent le clivage hydrolytique de liaisons peptidiques spécifiques dans leurs protéines cibles. Ces

enzymes sont largement distribuées. Les protéases microbiennes dominent le marché des enzymes en raison de leurs diverses propriétés physicochimiques et catalytiques (de Oliveira et al., 2016). Les isolats Bm1A, Bm2B et Bm3C produisent de la protéase fortement, alors qu'aucune production n'est remarquée chez les isolats Bm4D et BME8 (tableau V).

Les pectinases sont un groupe d'enzymes qui attaquent la pectine et la dépolymérise par hydrolyse et trans-élimination ainsi que par des réactions de dés-estérification, qui hydrolysent la liaison ester entre les groupes carboxyle et méthyle de la pectine (Ceci et Lozano, 1998). L'identification et la manipulation des inhibiteurs de la pectinase et de la protéinase dans les produits récoltés pourraient constituer un nouveau moyen efficace de lutter contre les maladies post-récolte (Wilson et al., 1991). A l'exception de la souche Bm3C, tous les isolats produisent de la pectinase (tableau V).

La cellulose est la biomasse la plus abondante sur terre. C'est le principal produit de la photosynthèse dans les environnements terrestres et aussi la bioressource renouvelable la plus abondante qui est produite dans la biosphère. La cellulose est généralement dégradée par une enzyme appelée cellulase. Cette enzyme est produite par plusieurs micro-organismes, dont les bactéries et les champignons (Sethi et al., 2013). Dans notre cas, tous les isolats produisent cette enzyme (tableau V, figure 8).

Lorsque les cellules végétales (hôtes) sont soumises à un stress pathogène, les chitinases végétales sont fortement exprimées et, par conséquent, les chitinases végétales jouent un rôle essentiel contre les agents pathogènes fongiques. Les chitinases sont également impliquées dans diverses réponses au stress abiotique comme les blessures, la pression osmotique, le froid et le stress des métaux lourds (Vaghela et al., 2022). Dans la présente étude, la chitinase est produite par tous les isolats (tableau V).

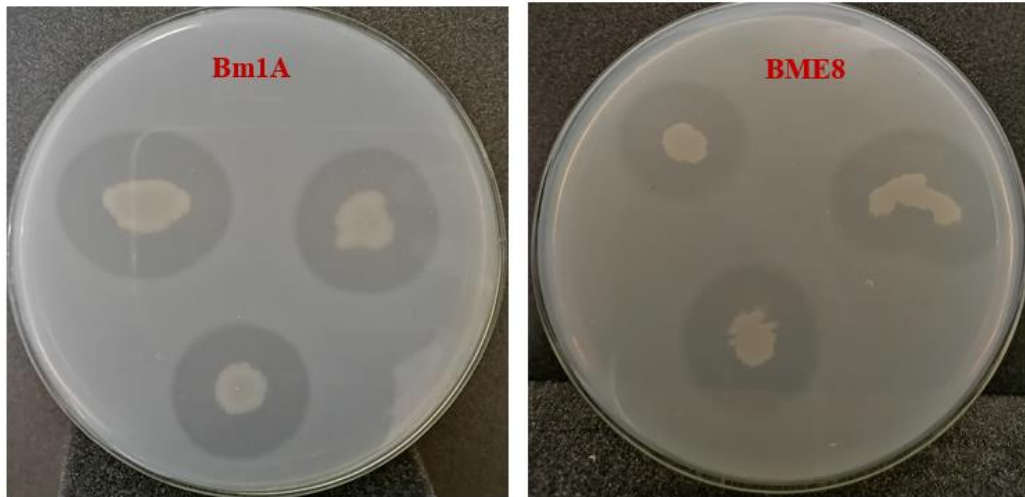
Les lipases sont des enzymes qui peuvent hydrolyser la liaison ester de l'acide gras à longue chaîne qui est principalement un composant de l'huile. Les sources de lipase se trouvent généralement dans la nature telles que les plantes, les animaux, les levures, les champignons et les bactéries (Boonmahome et Mongkolthanaruk, 2013). Les résultats de notre travail montrent que tous les isolats produisent la lipase à l'exception de l'isolat Bm2B (tableau V).

**Tableau V:** Production des enzymes hydrolytiques par les isolats sélectionnés.

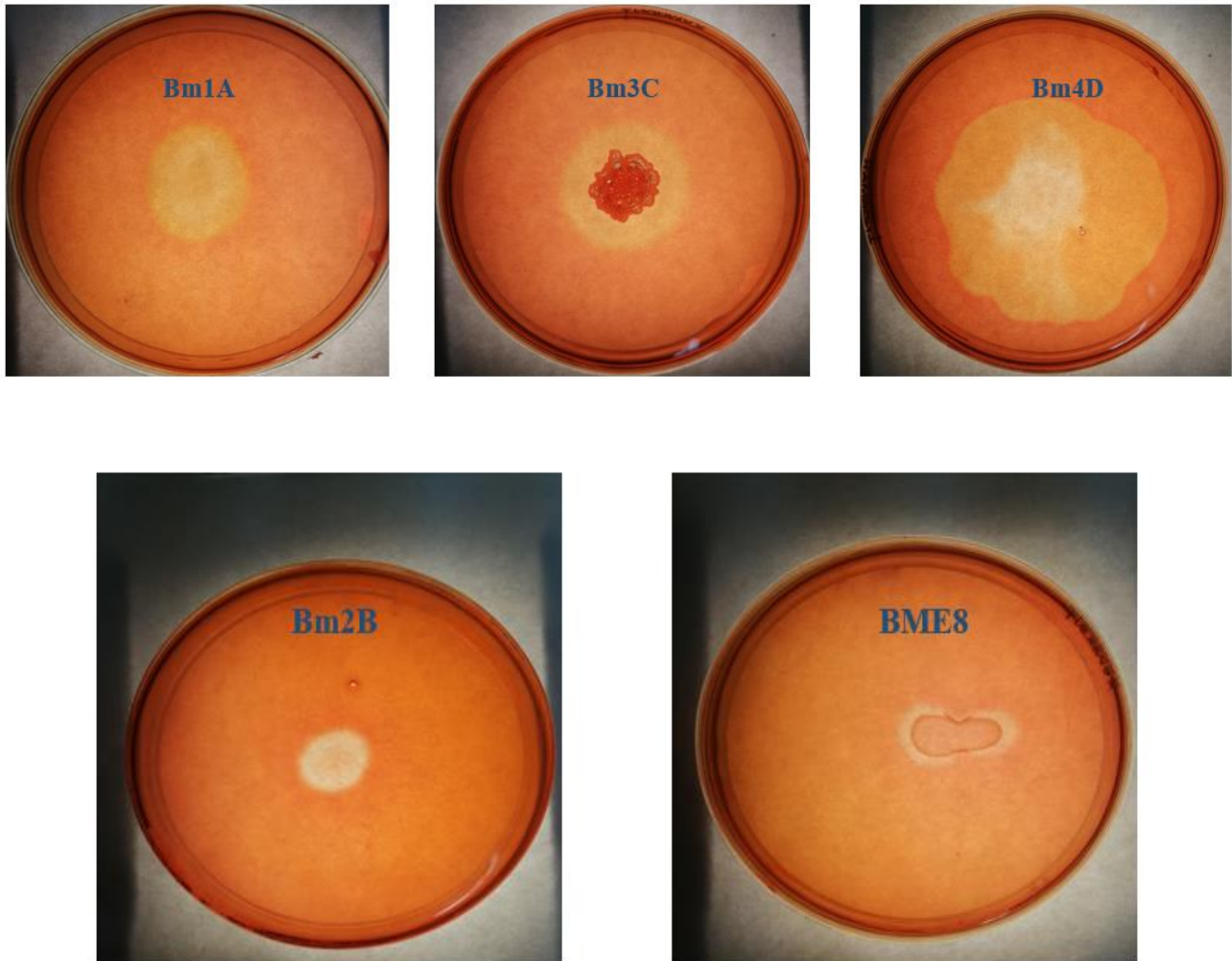
|                                    | <b>Bm1A</b> | <b>Bm2B</b> | <b>Bm3C</b> | <b>Bm4D</b> | <b>BME8</b> |
|------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b><math>\alpha</math>-amylase</b> | +           | -           | -           | -           | +           |
| <b>Protéase</b>                    | +           | +           | +           | -           | -           |
| <b>Cellulase</b>                   | +           | +           | +           | +           | +           |
| <b>Pectinase</b>                   | +           | +           | -           | +           | +           |
| <b>Chitinase</b>                   | +           | +           | +           | +           | +           |
| <b>Lipase</b>                      | +           | -           | +           | +           | +           |

(- ) Isolat sans activité enzymatique, ( + ) Isolat avec activité enzymatique.

**A**



**B**



**Figure 8** : La production de l' $\alpha$ -amylase (A) et de cellulose (B) par les isolats

## 2.2. Tests de tolérance à différentes températures, salinité, pH et stress hydrique

A l'exception de l'isolat Bm2B, tous les isolats ont la capacité de se développer dans des milieux salins entre 2 et 12%, et aussi à une température qui peut atteindre jusqu'à 50°C, et surmonter un stress hydrique jusqu'à 25%. Alors que l'isolat Bm2B ne supporte pas une salinité supérieure à 10%, et est également affectée par une température de 45°C et un stress hydrique de 20%. Alors que les cinq souches peuvent pousser dans la plage de pH comprise entre 3 et 11 (tableau VI).

**Tableau VI:** Tests de tolérance des isolats sélectionnés.

| <b>Caractéristiques</b>     | <b>Bm1A</b> | <b>Bm2B</b> | <b>Bm3C</b> | <b>Bm4D</b> | <b>BmE8</b> |
|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>NaCl (2%)</b>            | +           | +           | +           | +           | +           |
| <b>NaCl (4%)</b>            | +           | +           | +           | +           | +           |
| <b>NaCl (6%)</b>            | +           | +           | +           | +           | +           |
| <b>NaCl (8%)</b>            | +           | +           | +           | +           | +           |
| <b>NaCl (10%)</b>           | +           | +           | +           | +           | +           |
| <b>NaCl (12%)</b>           | +           | -           | +           | +           | +           |
| <b>T = 28 °C</b>            | +           | +           | +           | +           | +           |
| <b>T = 35 °C</b>            | +           | +           | +           | +           | +           |
| <b>T = 45 °C</b>            | +           | +           | +           | +           | +           |
| <b>T = 50 °C</b>            | +           | -           | +           | +           | +           |
| <b>pH 3</b>                 | +           | +           | +           | +           | +           |
| <b>pH 5</b>                 | +           | +           | +           | +           | +           |
| <b>pH 7</b>                 | +           | +           | +           | +           | +           |
| <b>pH 9</b>                 | +           | +           | +           | +           | +           |
| <b>pH 11</b>                | +           | +           | +           | +           | +           |
| <b>Stress hydrique (5%)</b> | +           | +           | +           | +           | +           |



|                              |   |   |   |   |   |
|------------------------------|---|---|---|---|---|
| <b>Stress hydrique (10%)</b> | + | + | + | + | + |
| <b>Stress hydrique (15%)</b> | + | + | + | + | + |
| <b>Stress hydrique (20%)</b> | + | + | + | + | + |
| <b>Stress hydrique (25%)</b> | + | - | + | + | + |

### 3. Identification moléculaire

Les caractérisations macroscopiques et microscopiques, bien qu'elles constituent des étapes fondamentales et préliminaires, elles restent sommaires et imprécises. Aussi et afin d'attribuer des profils acceptables et fiables aux isolats sélectionnés, une identification moléculaire s'avère indispensable et obligatoire.

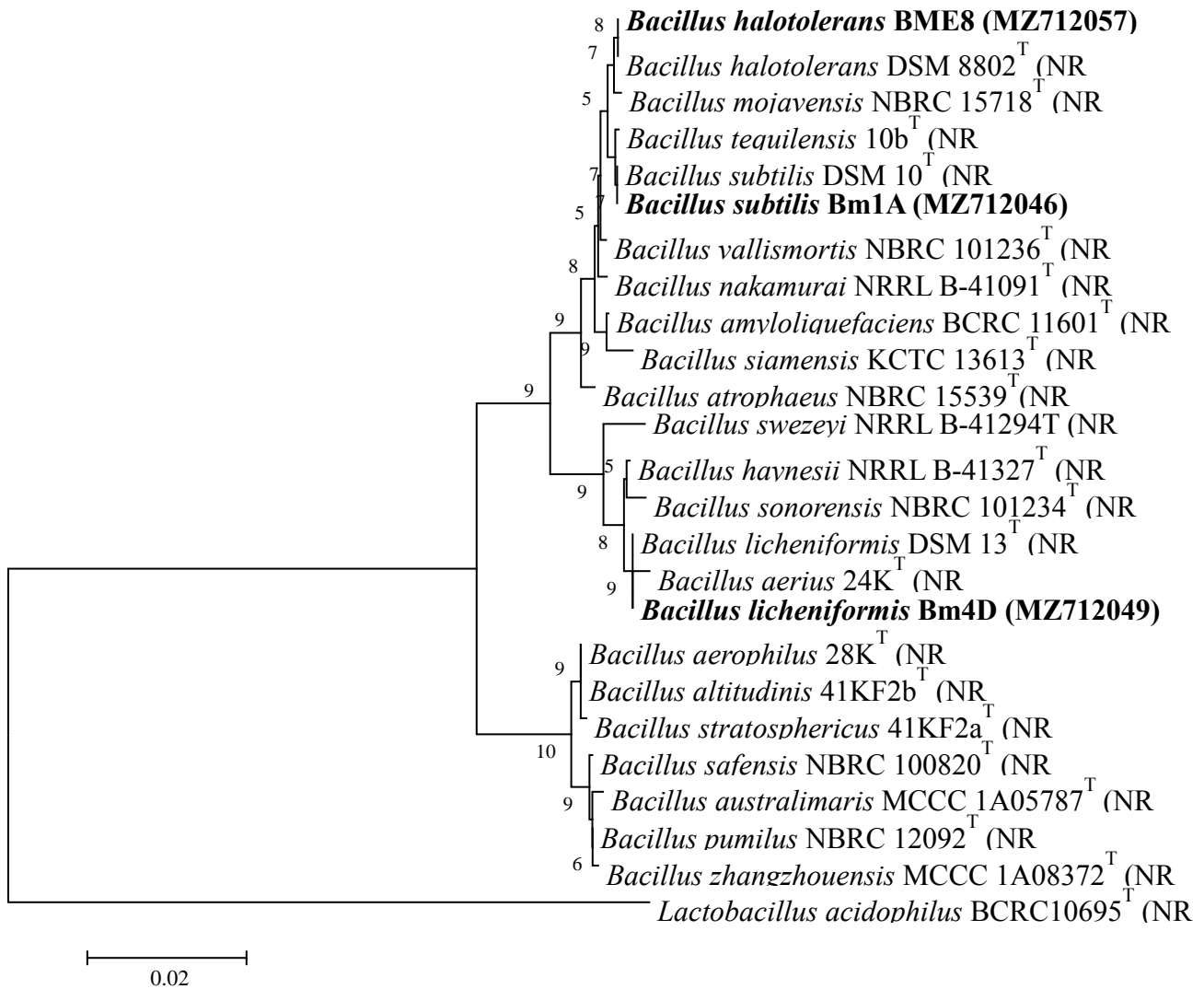
Pour identifier les isolats Bm1A, Bm2B, Bm3C, BM4D et BmE8, une extraction d'ADN ainsi qu'une amplification par PCR du gène de l'ARN ribosomal 16S suivie d'un séquençage ont été effectués. L'analyse du gène de l'ARNr 16S a été généralement acceptée pour son utilisation dans la classification bactérienne et la taxonomie avec précision (Kanso et al. 2011).

Sur la base d'une analyse PCR du gène de l'ARN 16S suivie d'un séquençage, l'isolat Bm1A a été identifié comme *Bacillus subtilis*, Bm2B comme *Sphingobium yanoikuyae*, Bm3C comme *Priestia aryabhatai* (anciennement *Bacillus aryabhatai* (Gupta et al. 2020)), Bm4D comme *Bacillus licheniformis* et BME8 comme *Bacillus halotolerans* (tableau VII). De plus, les genres ont été confirmés en soumettant les séquences FASTA à GenBank sous les numéros d'accession MZ712046, MZ712047, MZ712048, MZ712049 et MZ712057, respectivement. En effet, l'analyse BLASTN a révélé que les séquences d'ARNr 16S étaient similaires à celles de diverses espèces de *Bacillus*, *sphingomonas* et *Priestia*, comme le montre les arbres phylogénétiques des figures 9 et 10 et 11.

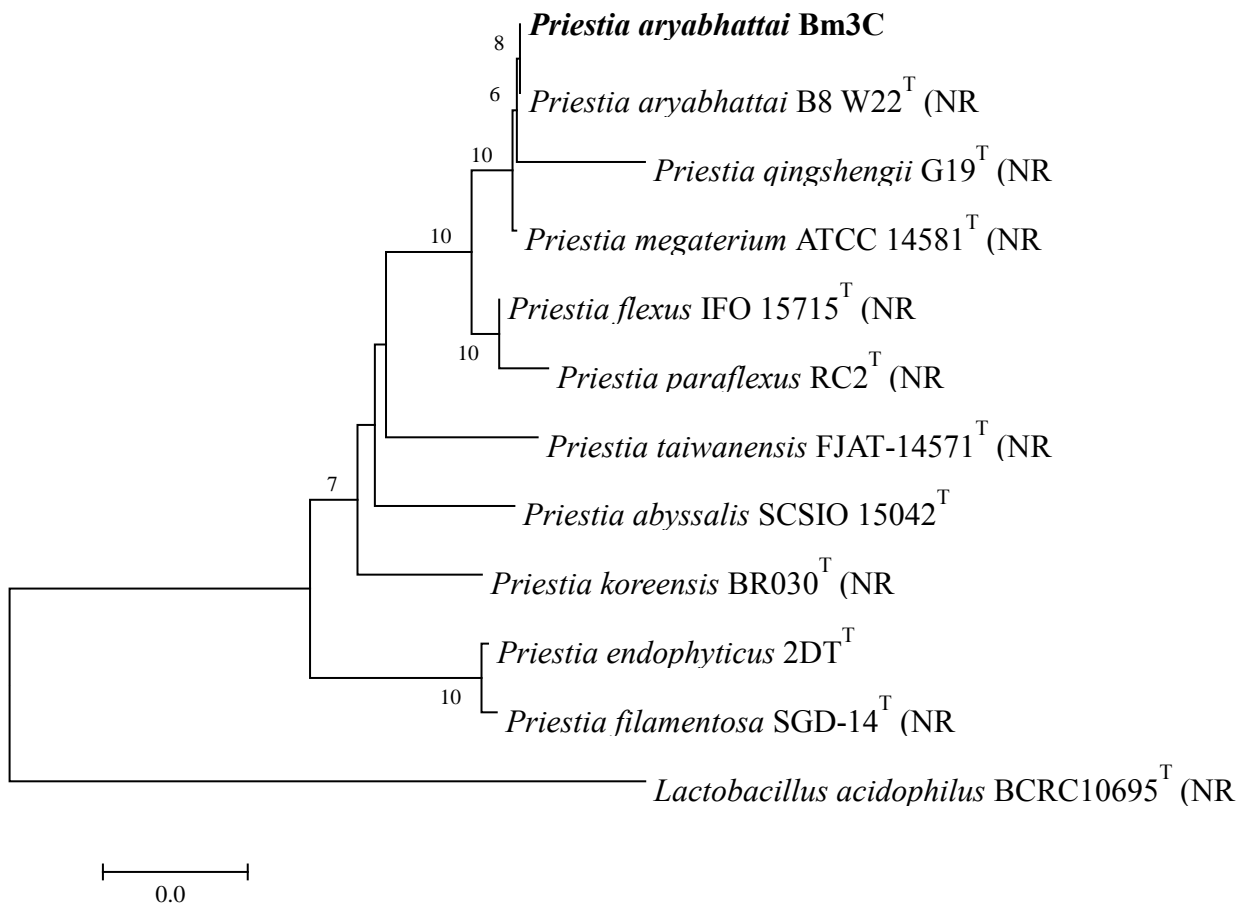
**Tableau VII :** Pourcentage d'identité nucléotidique des isolats sélectionnés et des souches types les plus apparentées.

| Isolats     | Longueur de l'ARNr 16S | Numéro d'accès | Souche                        | Pourcentage de similarité (%) |
|-------------|------------------------|----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <b>Bm1A</b> | 1433 nt                | MZ712046       | <i>Bacillus subtilis</i>      | 100                           |
| <b>Bm2B</b> | 1371 nt                | MZ712047       | <i>Sphingobium yanoikuyae</i> | 99.85                         |
| <b>Bm3C</b> | 1390 nt                | MZ712048       | <i>Priestia aryabhatai</i>    | 100                           |
| <b>Bm4D</b> | 1433 nt                | MZ712049       | <i>Bacillus licheniformis</i> | 100                           |
| <b>BME8</b> | 1433 nt                | MZ712057       | <i>Bacillus halotolerans</i>  | 100                           |

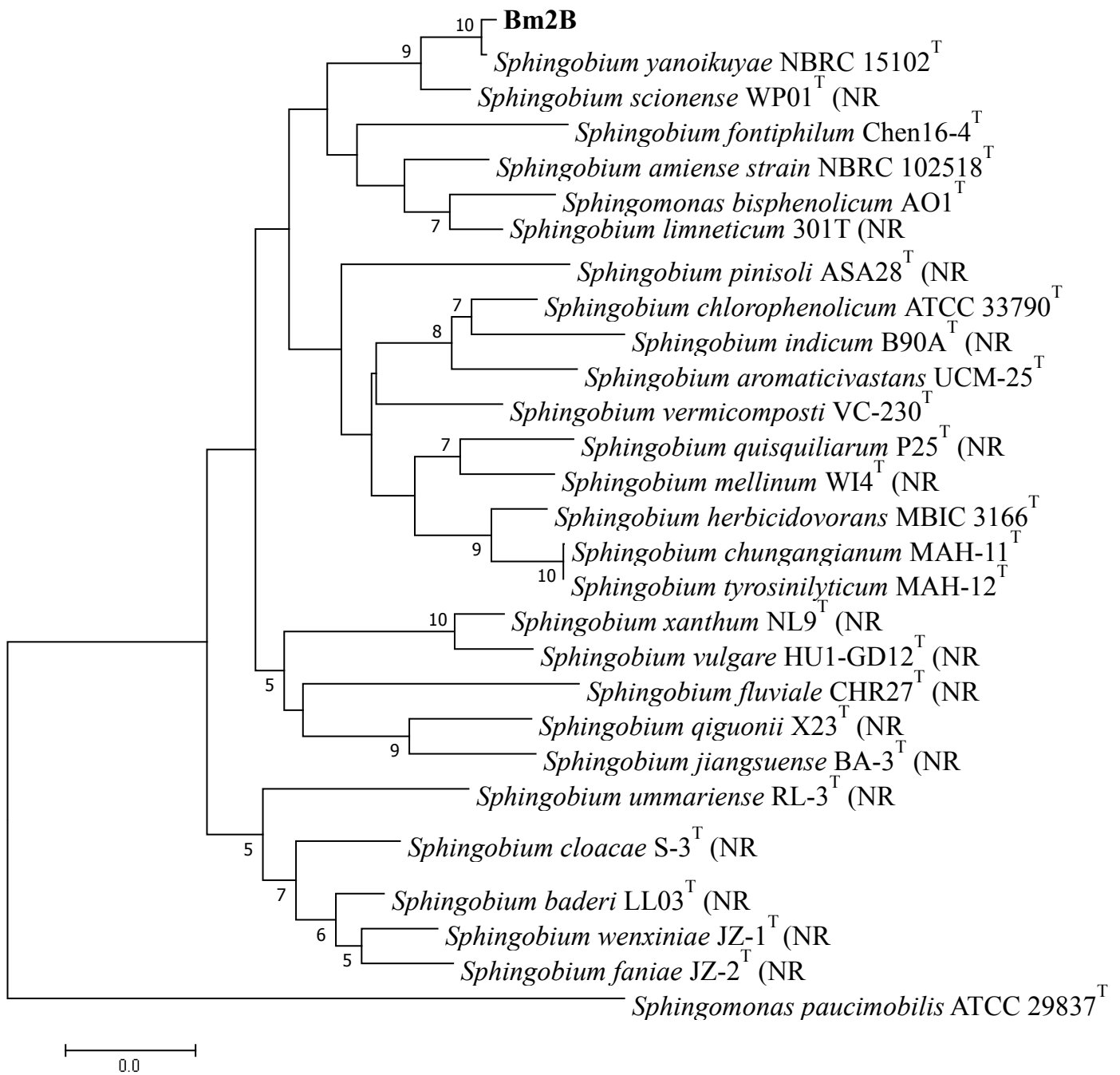
En fait, nous avons utilisé les séquences les plus similaires pour construire un arbre phylogénétique en utilisant la méthode de voisinage. Sur la base de l'arbre phylogénétique, il était évident que les bactéries isolées Bm1A, Bm4D et BmE8 sont des membres de la famille *Bacillaceae* et appartiennent au genre *Bacillus* (figure 9). Quand à la souche Bm3C est liée à la famille *Priestiacae* et précisément au genre *Priestia aryabhatai* (Figure 10). Finalement, la souche Bm2B appartient à la famille des *Sphingomonas* (figure 11).



**Figure 9** : Arbre phylogénétique voisin basé sur les séquences de gènes d'ARNr 16S des souches Bm1A, Bm3C et BME8 et d'espèces apparentées au sein du genre *Bacillus*. L'analyse était basée sur 1390 nucléotides. Les barres d'échelle représentent 0,02 substitution/site.



**Figure 10 :** Arbre phylogénétique voisin basé sur les séquences de gènes d'ARNr 16S de la souche Bm3C et des espèces apparentées du genre *Priestia*. L'analyse était basée sur 1390 nucléotides. Les barres d'échelle représentent 0,02 substitution/site



**Figure 11 :** Arbre phylogénétique voisin basé sur les séquences de gènes d'ARNr 16S de la souche Bm2B et des espèces apparentées du genre *Sphingomonas*. L'analyse était basée sur 1371 nucléotides. Les barres d'échelle représentent 0,01 substitution/site.

## **IV. Attributs de promotion de la croissance des plantes**

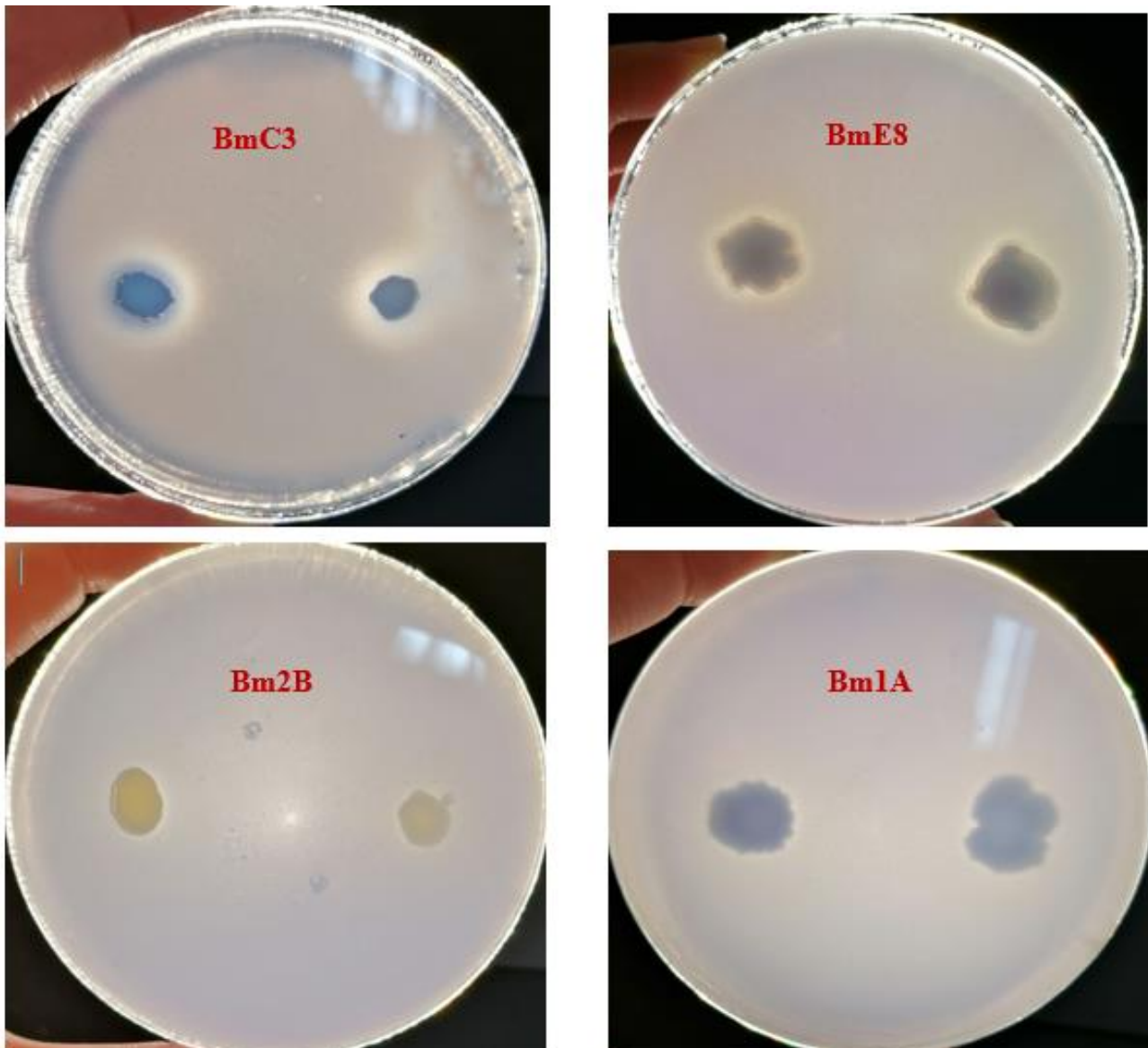
### **1. Fixation d'azote**

L'azote (N) est un nutriment limitant dans la plupart des environnements, la principale réserve d'azote dans la biosphère étant l'azote moléculaire  $N_2$  de l'atmosphère. Mais, l'azote moléculaire ne peut pas être directement assimilé par les plantes (Franche et al., 2009). Alors que, une grande diversité d'espèces bactériennes fixatrices d'azote a la capacité de coloniser la rhizosphère et fonctionner en symbiose avec les plantes. Dans le cas de nos souches, Bm1A, Bm3C, et BmE8 sont bien développées dans le milieu sans source d'azote, ce qui montre leur pouvoir de fixation de l'azote atmosphérique qui le cèdent par la suite aux plantes.

### **2. Solubilisation de phosphate**

Le phosphate (P) est un élément vital pour le développement et la croissance des plantes, il représente environ 0,2 % du poids sec d'une plante (Alori et al., 2017). Il est le second macronutriment requis pour la croissance des plantes après l'azote, et représente un facteur limitant où sa carence limite le plus souvent le développement des cultures. Il est impliqué dans la photosynthèse, la formation des graines et de nombreuses autres fonctions végétales rendant ainsi l'application d'engrais phosphatés nécessaire en agriculture intensive (Das et al., 2003). Cet élément se trouve généralement sous forme insoluble pour les plantes. Néanmoins, de nombreux micro-organismes du sol et de la rhizosphère ont la capacité de libérer du phosphate à partir des phosphates minéraux peu solubles présents dans les sols. Ainsi, ces micro-organismes sont importants pour fournir des phosphates du sol aux plantes (Yadav et Dadarwal, 1997).

Dans notre étude, les souches Bm3C et BmE8 représentaient les meilleures performances en solubilisation du P avec un indice de solubilisation de 2.12 et 1.83 respectivement. Alors qu'aucune solubilisation significative de phosphate n'a été remarquée pour Bm1A et Bm2B et elle est presque absente pour la souche Bm4D (figure 12).

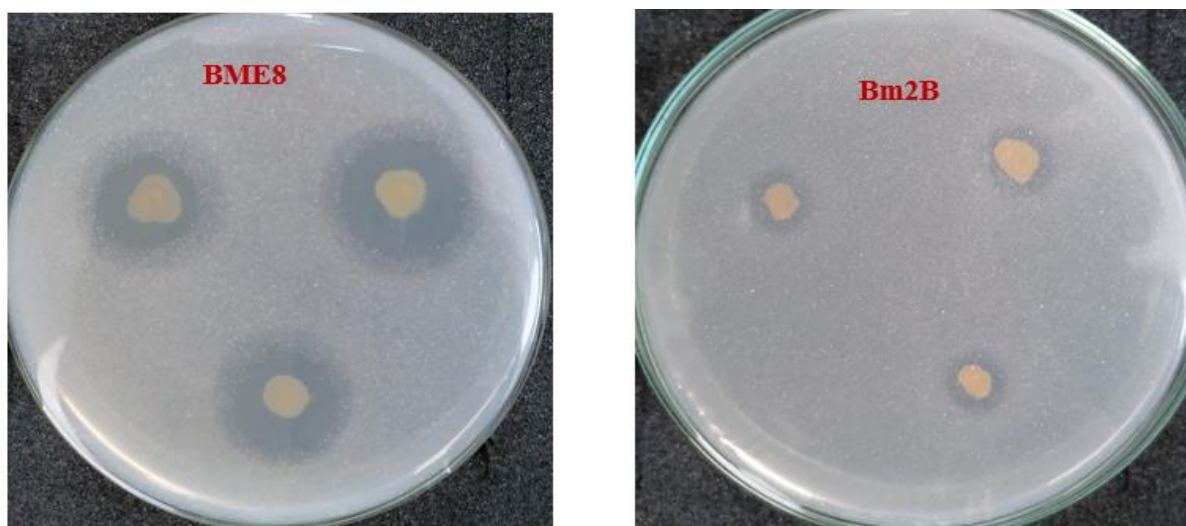


**Figure 12 :** La solubilisation de phosphate en milieu PVK par les souches bactériennes

### **3. Solubilisation de zinc et de potassium**

Le potassium (K) est le troisième macronutriment végétal le plus important après l'azote et le phosphore. Il est absorbé par le sol principalement sous forme de  $K^+$  et il est nécessaire aux plantes pour la croissance précoce, la production et la modification des protéines, le maintien de l'efficacité de l'utilisation de l'eau, la persistance et la longévité (Sharma et al., 2016). Quant au zinc (Zn) est l'un des micronutriments essentiels requis relativement en petites

concentrations (5–100 mg kg<sup>-1</sup>) dans les tissus pour une croissance optimale des plantes. La carence en zinc n'est pas très courante, mais elle peut survenir dans les sols calcaires, les sols cultivés de manière intensive, les sols sodiques et salins, les sols à haut statut de phosphore et de silicium assimilables et les sols sableux (Khanghahi et al., 2018). Selon les données présentées dans le tableau VIII, aucune des souches bactériennes ne solubilise le potassium (K), alors que les souches BME8 et Bm3C solubilisent le Zn (figure 13).



**Figure 13 :** Solubilisation du Zn par les souches BME8 et Bm2B

**Tableau VIII:** Les attributs de la promotion de la croissance des plantes assurés par les souches sélectionnées.

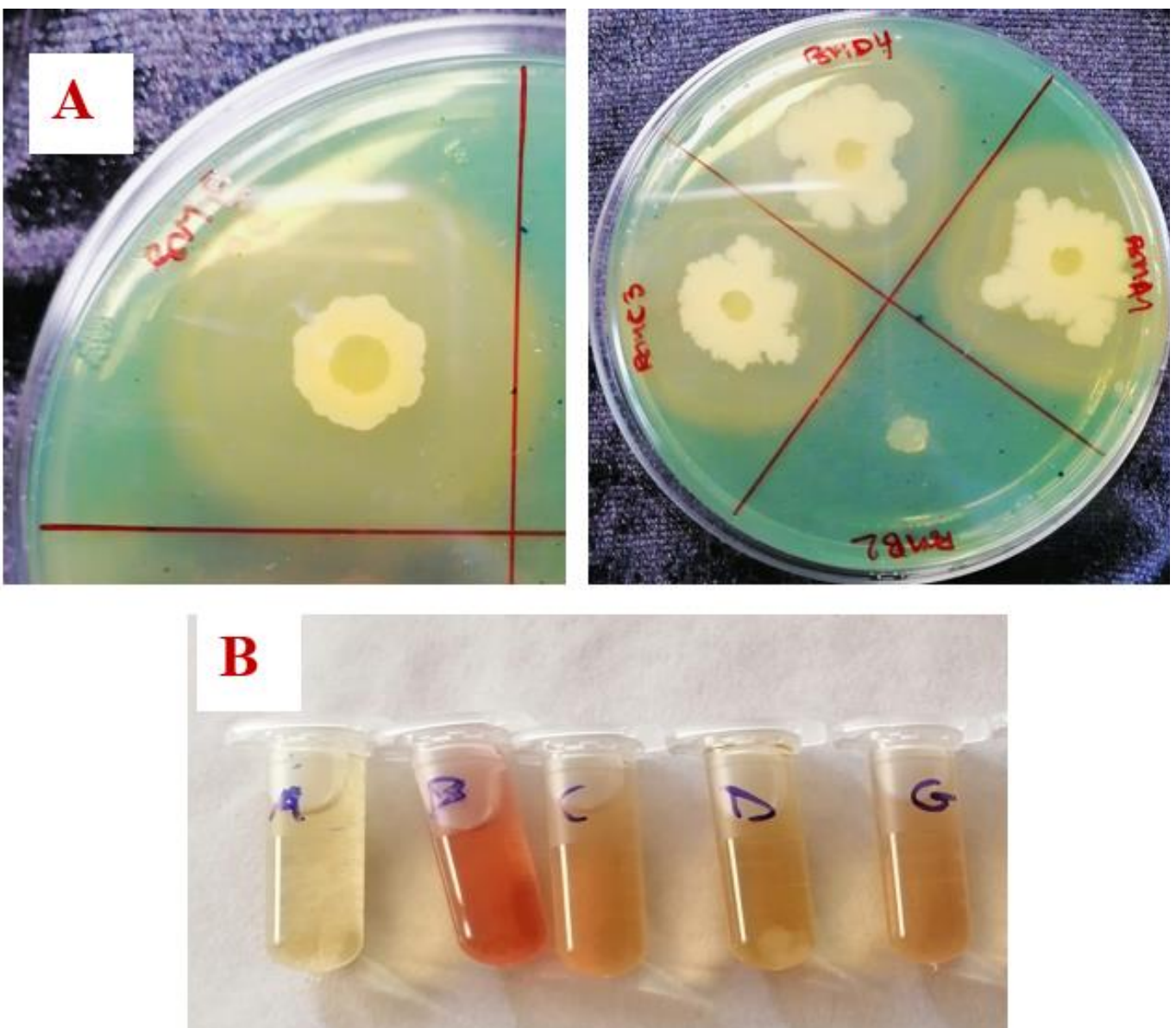
|                             | <b>Bm1A</b> | <b>Bm2B</b> | <b>Bm3C</b> | <b>Bm4D</b> | <b>BME8</b> |
|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Fixation d’N</b>         | ++          | +           | ++          | +           | ++          |
| <b>Solubilisation du P</b>  | +           | +           | ++          | +           | ++          |
| <b>Solubilisation du K</b>  | -           | -           | -           | -           | -           |
| <b>Solubilisation du Zn</b> | -           | +           | -           | -           | ++          |



#### 4. Production de l'AIA et sidérophores

Les phytohormones sont largement présentes dans la nature dont la plus active est l'acide indole-3-acétique (AIA). En fait, l'AIA est responsable de la division, de l'expansion et de la différenciation des cellules et des tissus végétaux. En plus, la promotion des processus de formation du xylème et des racines est la plus prononcée parmi les divers effets de cette phytohormone (Tsavkelova et al., 2005). La souche Bm2B (B) produit l'AIA fortement, suivie par Bm3C (C), Bm4D (D), BME8 (G) et Bm1A (A) (figure 14 B).

Pour les sidérophores, à l'exception de Bm2B, toutes les souches sont entourées par un halo jaune large, ce qui confirme leur production des sidérophores (figure 14 A).



**Figure 14 :** La production des sidérophores (A) et la production de l'AIA (B).

## V. Discussion

Cette étude visait à déterminer l'effet insecticide des souches Bm1A, Bm2B, Bm3C, Bm4D et BME8 sur les femelles adultes et les larves de *D. opuntiae* et leur pouvoir de réduction de la densité de la cire protectrice. Ainsi, parmi toutes les souches testées en laboratoire, *Bacillus halotolerans* (BME8) est la plus efficace contre les larves et les femelles, suivie de *Priestia aryabhatai* (Bm3C), puis de *Bacillus subtilis* (Bm1A). En revanche, *Bacillus licheniformis* (Bm4D) présentait une toxicité modérée pour les femelles adultes et les larves de *D. opuntiae*, mais une activité importante dans la réduction de la densité des filaments cireux protecteurs. Au contraire, la souche Bm2B (*Sphingobium Yanoikuyae*) n'a présenté aucune activité insecticide contre les insectes.

Toutes ces souches sont des Gram+ et ont la capacité de se développer dans des milieux salins entre 2 et 12%, et aussi à une température qui peut atteindre jusqu'à 50°C, et surmonter un stress hydrique jusqu'à 25%. Seule *Sphingobium yanoikuyae*, une bactérie à Gram négatif, ne supporte pas une salinité supérieure à 10%, et est également affectée par une température de 45°C et un stress hydrique de 20%.

En faisant la caractérisation des traits PGPR de ces bactéries, ce sont *Bacillus subtilis*, *Priestia aryabhatai*, et *Bacillus halotolerans* qui ont démontré un pouvoir de fixation de l'azote atmosphérique et un pouvoir de solubilisation du P en milieu PVK (indice de solubilisation entre 2,12 et 1,83). Ces résultats rejoignent ceux de l'étude réalisée par Hiremath, (2012) suggérant que l'isolat de sol de la souche AS-4 de *Bacillus subtilis* a une capacité de fixation de l'azote et peut tolérer une concentration élevée en sel. De plus, Zaidi et al. (2009) ont signalé que *B. subtilis* est directement impliqué dans la solubilisation du P et présente une synergie avec les champignons mycorhiziens arbusculaires. D'autre part, la souche *Priestia aryabhatai* BPR-9 s'est révélé être un puissant promoteur de croissance des cultures tolérant au stress multiple après des tests *in vitro* approfondis sur les attributs favorisant la croissance des plantes, et l'efficacité de la solubilisation des nutriments (phosphate; potassium; et zinc) (Shahid et al., 2022). Au contraire, dans notre étude, la souche *Priestia aryabhatai* n'a pas solubilisé le potassium. Elakhdar et al., (2020) ont démontré que *Bacillus halotolerans* avait la capacité de fixer l'azote la capacité de solubiliser le phosphate. Alors que parmi ces trois, seule *Bacillus halotolerans* a démontré un pouvoir de solubilisation de Zn et aucune des trois n'a présenté un effet pour la solubilisation de K. Nos résultats sont similaires aux ceux trouvés par Fahsi et al., (2021), où la souche *Bacillus halotolerans* a solubilisé le Zn. Enfin la capacité de synthèse de

l'acide indole acétique AIA a été démontrée aussi chez ces bactéries, avec une faible intensité chez *Bacillus subtilis* et forte intensité chez *Sphingobium yanoikuyae*. L'AIA est connu par son rôle dans la stimulation et le développement racinaire et l'absorption des nutriments chez les plantes. Aussi, nous avons démontré la capacité de ces souches à produire des sidérophores à l'expectation de *Sphingobium yanoikuyae*. Ces peptides jouent un rôle important dans la mobilisation du fer pour la rendre disponible aux plantes.

Par ailleurs, la souche BME8 (*Bacillus halotolerans*) a causé la mortalité la plus élevée chez les femelles et les larves avec de faibles concentrations (100% de la mortalité à  $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup> en 24 h) outre son potentiel de dégradation des filaments cireux protecteurs. Les enzymes produites par cette souche ont joué un rôle très important dans la réduction des cochenilles et la dégradation des filaments cireux. Lorsque la cuticule de l'insecte comprend une épaisse pro-cuticule recouverte d'une fine épicuticule riche en lipides et en protéines (Binod et al., 2007). En fait, cette souche produit de la lipase et de la protéase. Il est bien connu que la fonction des lipases est d'hydrolyser les liaisons ester des lipoprotéines, des lipides et des cires à l'intérieur du tégument de l'insecte (Dar et al., 2017.). De même, Etemadzadeh et Emtiazi (2021) ont déterminé la présence de leucine (43,18%), de valine (9,46%), d'acide aspartique (6,53%) et d'acide glutamique (9,82%) dans le lipopeptide purifié de la souche de *Bacillus halotolerans* SCM 034. Fait intéressant, les formes 4-isopropyle et isobutyle obtenues à partir de la valine et de la leucine ont une forte activité insecticide (Eto et al., 1978). De plus, Gul et al. (2020) ont étudié les effets toxiques de l'acide aspartique sur l'aleurode *Bemisia tabaci* en augmentant le niveau d'aspartate dans la culture de coton, ce qui s'est avéré prometteur pour contrôler l'infestation d'aleurodes, les dommages post-infestation et améliorer la santé et le rendement des plants de coton. D'autre part, de son potentiel de contrôle des insectes, l'acide glutamique a été utilisé pour améliorer l'activité insecticide de l'acide aminé–le tralopyril (Li et al., 2021).

De plus, le principal polysaccharide présent chez les insectes et de nombreux autres animaux est la chitine (Merzendorfer et Zimoch, 2003). La chitine est un composant clé de la cuticule, la couverture la plus externe d'un insecte qui agit comme un exosquelette et protège contre les substances nocives (Muthukrishnan et al., 2012). À cet égard, l'utilisation de microorganismes dégradant la chitine est une stratégie de biocontrôle très importante, qui convertit la chitine en composés pouvant servir de sources de carbone et d'azote (Driss et al., 2005). Les cinq souches bactériennes utilisées dans cette étude produisent de la chitinase.

La souche Bm3C (*Priestia aryabhatai*) a également montré d'excellents résultats dans le contrôle des femelles et des larves de cochenille en laboratoire, réduisant le taux de survie de 100% à 0% à  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> en 12 h. Cependant, lorsqu'elle est appliquée aux femelles de cochenille couvertes, seulement 12,5% sont mortes à  $10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>, démontrant que la souche Bm3C ne pouvait pas dégrader et décomposer les filaments cireux protecteurs. A cet égard, cette souche est la seule qui n'a pas produit de pectinase et de protéase, ce qui pourrait être la raison de ne pas dégrader la cire protectrice. Antérieurement, *Priestia aryabhatai*, a été testée contre les nématodes (Antil et al., 2021; Viljoen et coll., 2019; Zhao et coll., 2020). Cependant, la présente étude est la première qui a mis en évidence l'effet insecticide de ladite souche. Il a un bon effet insecticide sur les larves et les femelles de la cochenille, mais comme il ne peut pas pénétrer ou détruire la cire de couverture, il peut contrôler d'autres cochenilles. En revanche, dans les tests de laboratoire, Bm4D a montré une toxicité modérée pour les femelles adultes et les larves, avec une activité importante dans l'hémolyse des filaments cireux.

D'un autre côté, l'application de la souche Bm1A (*Bacillus subtilis*) a efficacement hémolysé la cire protectrice. Même avec son efficacité modérée dans les expériences du laboratoire ; c'était le deuxième traitement le plus efficace en serre. De plus, le taux de survie de 55% à  $10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup> montre son pouvoir de dégradation de la cire protectrice hydrophobe des femelles. L'efficacité de cette souche dans l'hémolyse de la cire pourrait s'expliquer par sa capacité de produire des enzymes de manière élevée, en particulier la chitinase, la lipase et la protéase. Les mêmes résultats ont été obtenus dans l'étude de Salunkhe et al., (2013), où *Bacillus subtilis* contrôlait *Maconellicoccus hirsutus* en hémolysant sa cire protectrice.

D'autre part, l'enzyme brute de *Bacillus subtilis* a été testée sur des femelles et des larves de la cochenille par Idris et al. (2019), provoquant une grande mortalité à 35%, 65% et 100% et dégradant la cire. Ces résultats sont liés à l'activité enzymatique de la chitinase et de la lipase dans les souches de *Bacillus subtilis* (Idris et al., 2019). La toxicité de la chitinase est causée par l'hydrolyse enzymatique de la chitine chez les insectes (Suganthi et al., 2017). Cependant, l'efficacité de *Bacillus subtilis* dans la réduction de la teneur en cire des cochenilles peut être attribuée à sa capacité à produire de la lipase et de la chitinase, qui joueraient un rôle dans la nutrition de la bactérie (Tielen et al., 2010).

Le potentiel des microorganismes associés aux racines pour réguler les phytopathogènes est bien établi en réponse aux attaques des phytopathogènes, les microorganismes de la rhizosphère

ou des racines des plantes libèrent des enzymes lytiques (Mishra et al., 2020). Les bactéries utilisées dans cette étude ont été étudiées pour produire six enzymes qui jouent un rôle important dans la lutte biologique contre les ravageurs des plantes : l'amylase, la protéase, la pectinase, la chitinase et la lipase. La protéase produite par *Trichoderma* et *Pseudomonas fluorescens* a contribué au biocontrôle des nématodes (Siddiqui et al., 2005; Suarez et coll., 2004). Selon Suarez et al. (2004), la protéase détruit la couche de protéine de chitine dans les œufs des nématodes, ce qui a un impact sur le développement embryogène normal de *M. incognita*. Par ailleurs, l'activité pectinase a été observée dans toutes les souches à l'exception de la Bm3C. Le fait que la souche Bm3C ne produise pas de pectinase pourrait expliquer sa faible efficacité dans le traitement réalisé dans l'expérience en serre. Or, la pectinase joue un rôle important dans la dégradation des filaments cireux produits par les cochenilles femelles. D'un autre côté, certes, les études sur l'effet de la pectinase, de la lipase et de la chitinase sur les insectes sont rares, cependant, leurs activités sur des champignons phytopathogènes ont été évaluées (Ben Khedher et al., 2021; Sadeghi et coll., 2017; Saraf et coll., 2008).

En ce qui concerne l'impact des bactéries de biocontrôle sur l'expression métabolique de la plante hôte, peu de données sont disponibles aujourd'hui. Dans cette étude, l'application de ces traitements bactériens à des concentrations élevées n'a probablement pas pu affecter négativement l'hôte. En fait, il a été démontré que les espèces de bacilles, dérivées des racines des plantes, ont des effets positifs sur les plantes, notamment en favorisant le développement des plantes, en réduisant le stress biotique, en induisant une résistance systémique et en favorisant la santé des plantes (Hashem et al., 2019). De plus, aucune étude n'a démontré l'impact négatif de ces souches sur les plantes, ce qui encourage leur utilisation pour la cicatrisation et la régénération de la plante à côté de leur application comme agents de biocontrôle.

## **VI. Récapitulation**

La présente étude démontre que la réduction des filaments cireux des cochenilles est l'outil le plus important pour les contrôler. À cet égard, l'utilisation de souches bactériennes ayant le potentiel de dégrader les filaments cireux et de détruire les insectes dans une formulation de consortium pourrait être une bonne alternative pour lutter contre les insectes cochenilles. Ainsi, ces souches, en plus de leur effet biopesticide, ont démontré des effets prometteurs de croissance des plantes et une grande capacité à surmonter les conditions de stress abiotiques à l'exception de *Sphingobium yanoikuyae* (Gram-) qui a prouvé moins de résistance.

**Chapitre III : Activité antifongique  
des souches bactériennes isolées des  
racines du cactus «*Opuntia ficus  
indica*» vis-à-vis *Fusarium oxysporum*  
*f. sp. albedinis*, *Alternaria solani* et  
*Verticillium dahliae***

## A. Introduction

Les maladies des plantes causées par des champignons phytopathogènes menacent perpétuellement la durabilité de la production végétale mondiale (Mullins et Kang, 2001). Ils sont la cause principale dans la détérioration des fruits et légumes, en raison de leur pathogénicité (Moss, 2008). En effet, au cours des différentes étapes de la pathogenèse, certains de ces champignons peuvent générer différentes mycotoxines, des métabolites secondaires toxiques pour les humains et les animaux qui consomment ces produits (Saleh et Al-Thani, 2019).

Parmi les champignons les plus propagées et dont certains peuvent attaquer le figuier de barbarie, figurent *Fusarium oxysporum* et *Alternaria solani*.

*Fusarium oxysporum* est l'agent causal de la fusariose qui s'est avérée être la maladie la plus destructrice affectant un large éventail de plantes comprenant des mauvaises herbes et des plantes et cultures domestiquées commercialement ainsi que le figuier de barbarie. La maladie entraîne des symptômes variés. Chez le figuier de barbarie par exemple, les plantes infectées peuvent présenter des symptômes tels qu'un retard de croissance et un flétrissement si la pourriture des racines devient grave (Pettinari, 1951). En plus du manque de vigueur et du flétrissement de la plante, cette maladie présente autres symptômes tels que le flétrissement pendant la journée, et une chlorose foliaire tandis que les symptômes internes des tissus vasculaires affectés démontrent une couleur brunâtre ou noire (Bishop et Cooper, 1983).

*Alternaria solani*, est l'une des maladies foliaires courantes. Cette maladie peut survenir dans un large éventail des conditions climatiques, mais elle est plus grave dans les zones à forte humidité relative causée par une forte rosée ou des précipitations combinées à des températures moyennes élevées (Fritz et al., 2006). Sur les cladodes ou les fruits, les premiers signes sont des taches chlorotiques rondes qui finissent par devenir sombres et nécrotiques (Granata et Sidoti, 2002).

Par ailleurs, *Verticillium dahliae*, est un important pathogène fongique transmis par le sol dans les climats chauds (Nachmias et al., 1988). Il est responsable de la verticilliose notamment chez l'olivier (Barguigua et al., 2021). L'agent pathogène survit dans le sol sous forme de microsclérotés qui, après leur germination, pénètrent par les racines et colonisent le système vasculaire de la plante qui subira un retard de croissance et la mort précoce des plantes (Perry

et Evert, 1984). La verticilliose provoque une réduction du rendement de 30 à 50% chez les plantes sensibles et de 5 à 10% chez les plantes tolérantes (Isaac et Harrison, 1968).

D'un autre côté, le contrôle des maladies des plantes est le plus efficace lorsque toutes les informations disponibles concernant la culture, l'agent pathogène, les conditions environnementales, les mesures de contrôle et leurs coûts sont prises en compte.

Dans ce sens, il existe différentes méthodes pour le traitement de ces maladies, et la méthode la plus répandue dans le monde, et encore au pays en développement sont les fongicides chimiques. Alors que, l'utilisation aveugle de ces produits a généré beaucoup d'effets néfastes sur l'environnement, perturbant l'équilibre écologique des sols et rendant les plantes encore plus résistantes aux ravageurs et aux agents pathogènes (Mahmood et al., 2016). De ce fait, la préoccupation accrue du public à l'égard des questions environnementales suscite une gestion alternative des maladies basée sur des pratiques culturelles et sur l'utilisation des composés naturels. Compte tenu de ce besoin de développer des méthodes de contrôle appropriées contre les maladies cryptogamiques, nous avons évalué la capacité des bactéries isolées des racines du figuier de barbarie à contrôler le développement de ces trois champignons pathogènes.

## **B. Matériel et méthodes**

### **I. Effet antifongique des souches bactériennes isolées des racines du cactus**

#### **1. Souches bactériennes**

Les souches bactériennes utilisées pour ce test sont les mêmes qui ont montré un effet antagoniste positif contre les cochenilles citées dans les précédents chapitres.

#### **2. Souches fongiques**

Les champignons employés (*Fusarium oxysporum f. sp. albedinis*, *Alternaria solani* et *Verticillium dahliae*) au cours ce travail ont été fournis aimablement par le Laboratoire De Biotechnologie et Prestations de Service, Meknès (LBPS).



### 3. Etude de l'antagonisme bactérie-champignon *in vitro*

L'effet inhibiteur des souches bactériennes Bm1A, Bm2B, Bm3, Bm3C et BME8 sur la croissance de *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis* (FOA), *Alternaria solani* et *Verticillium dahliae* a été évalué par la méthode de double culture (Kunova et al., 2016). Un disque de mycélium de 5 mm coupé à partir de chaque culture de FOA, *Alternaria solani* et *Verticillium dahliae* âgée de 5 jours, a été placé au centre de la boîte de Pétri et cultivé pendant 3 jours à l'avance. Par la suite, les souches Bm1A, Bm2B, Bm3, Bm3C et BME8 de la culture âgée de 2 jours, a été striée à environ 2,5 cm du disque au centre des plaques. L'eau distillée a été utilisée comme contrôle négatif. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 4 jours. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne a été calculé selon l'étude menée par Sharma et al. (2019).

En fait, le pourcentage d'inhibition a été calculé par rapport au témoin en utilisant l'équation suivante (El Hassni et al. 2007).

$$\text{Inhibition (\%)} = [(C_0 - C_t)/C_0]*100$$

C<sub>0</sub> est le diamètre de la colonie dans le témoin ; C<sub>t</sub> est le diamètre de la colonie dans le traitement.

## II. Extraction des principes actifs des souches bactériennes isolées de la rhizosphère du cactus

Les substances bioactives ont été extraites par l'acétate d'éthyle comme il a été décrit par (Zahir et al., 2014) avec des modifications minimales. Ainsi, un inoculum de chaque souche bactérienne a été cultivé auparavant sous agitation rotative à 200 tr / min à 37°C pendant 48 h dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de bouillon LB. Après incubation, les cultures bactériennes ont été centrifugées pendant 10 min à 6000 tr / min à 4°C. Ensuite, le surnageant a été récupéré, stérilisé par filtration et ajouté à 100 ml d'acétate d'éthyle. Après deux heures d'agitation à la température ambiante, le mélange a été déplacé à une ampoule de décantation pendant 2 heures afin de séparer la phase liquide de la phase organique qui contient les substances bioactives. Ensuite, l'extrait organique obtenu est évaporé sous vide à 37°C. Le résidu sec est repris dans 1 ml de l'eau distillée.

### III. Effet antifongique des extraits des souches bactériennes isolées de la rhizosphère du cactus

Un disque de 4 mm (papier Wattman) imprégné de 20 µl de chaque extrait de substances bioactives a été transféré dans une boîte de Pétri stérile contenant du milieu PDA et étalé avec les champignons cibles pour s'assurer de la réussite de l'extraction. L'activité antifongique a été évaluée après incubation à 37°C pendant 48h. L'eau distillée a été utilisée comme témoin négatif.

#### C. Résultats

##### I. Effet antifongique des souches bactériennes isolées de la rhizosphère du cactus

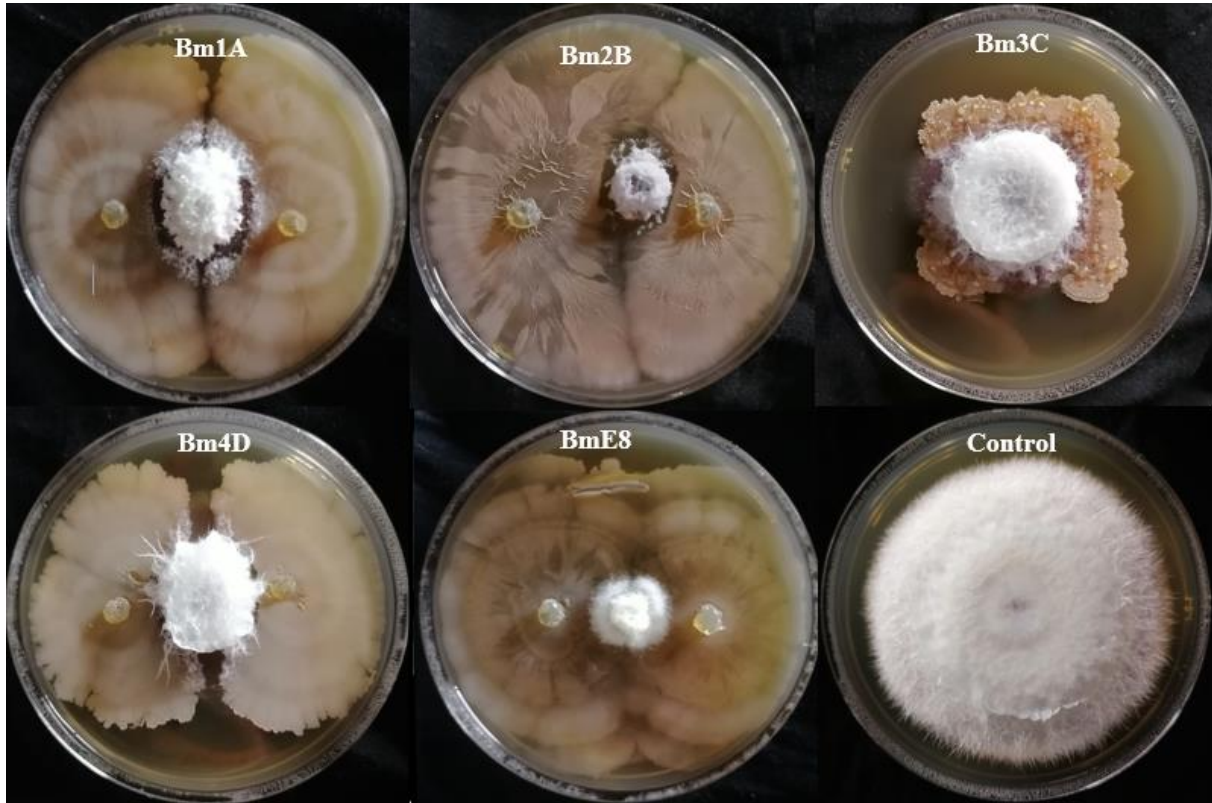
Afin de vérifier le potentiel antagoniste des souches Bm1A, Bm2B, Bm3C, Bm4D et BME8 sur les agents pathogènes, les bactéries ont été cultivées en double culture avec des agents pathogènes fongiques des plantes. Les résultats sont présentés dans le tableau IX. Toutes les souches bactériennes ont pu inhiber la croissance des pathogènes fongiques significativement, sauf pour *Verticillium dahliae*, l'inhibition était moins sévère.

**Tableau IX:** Pourcentages d'inhibition des champignons phytopathogènes par les souches étudiées.

|             | Halo d'inhibition (%)               |                          |                             |
|-------------|-------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
|             | <i>Fusarium oxysporum albedinis</i> | <i>Alternaria solani</i> | <i>verticillium dahliae</i> |
| <b>Bm1A</b> | 75,0±1                              | 81,86 ±0,84              | -                           |
| <b>Bm2B</b> | 80,66 ±0,57                         | 76,47 ±1,47              | 47,48 ±0,42                 |
| <b>Bm3C</b> | 58,0 ±1,64                          | 84,31 ±0,69              | 23,90 ±2,17                 |
| <b>Bm4D</b> | 70,66 ±2,08                         | 74,01 ±0,25              | 34,77 ±0.17                 |
| <b>BmE8</b> | 76.66 ±0.57                         | 77,45 ±0.84              | 26,08 ±1,76                 |

## 1. Effet inhibiteur des souches contre *Fusarium oxysporum albedinis* (FOA)

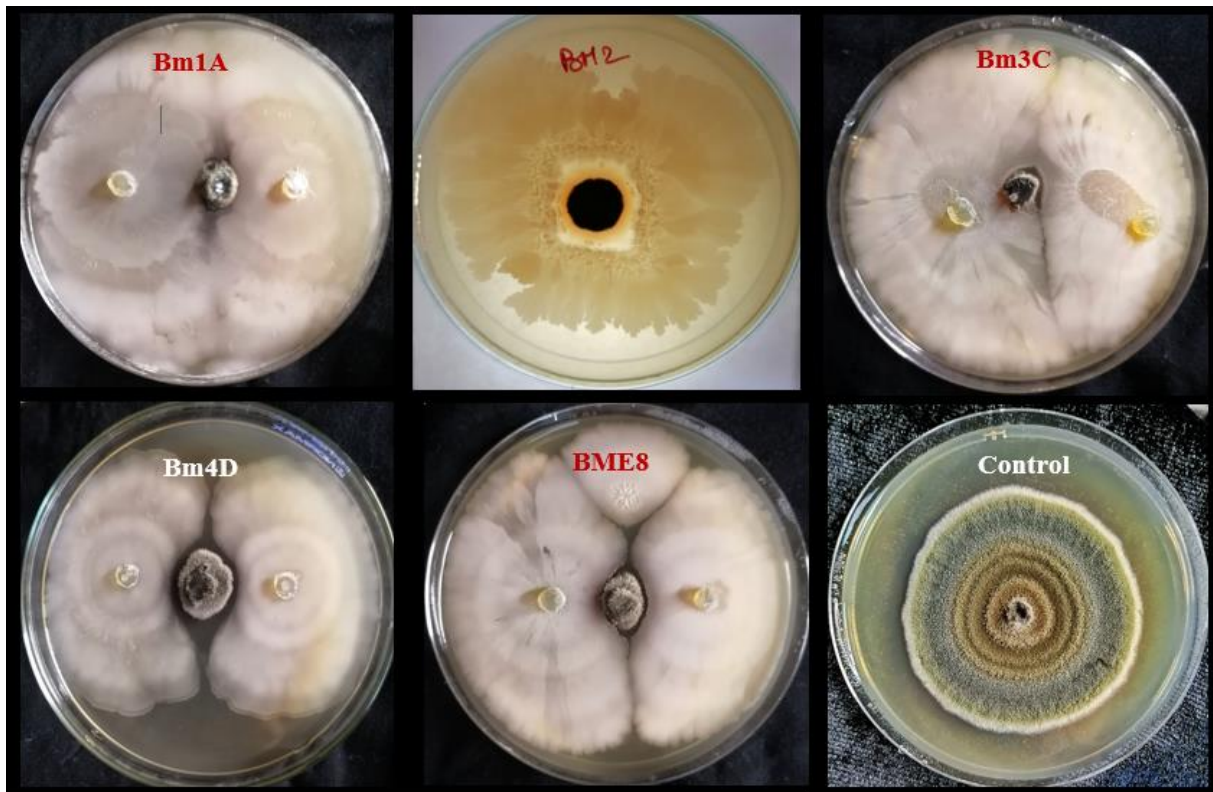
Les cinq souches présentent une bonne inhibition de la croissance mycélienne des FOA (Figure 15).



**Figure 15:** Effet inhibiteur des souches étudiées contre *Fusarium oxysporum albedinis*.

## 2. Effet inhibiteur des souches contre *Alternaria solani*

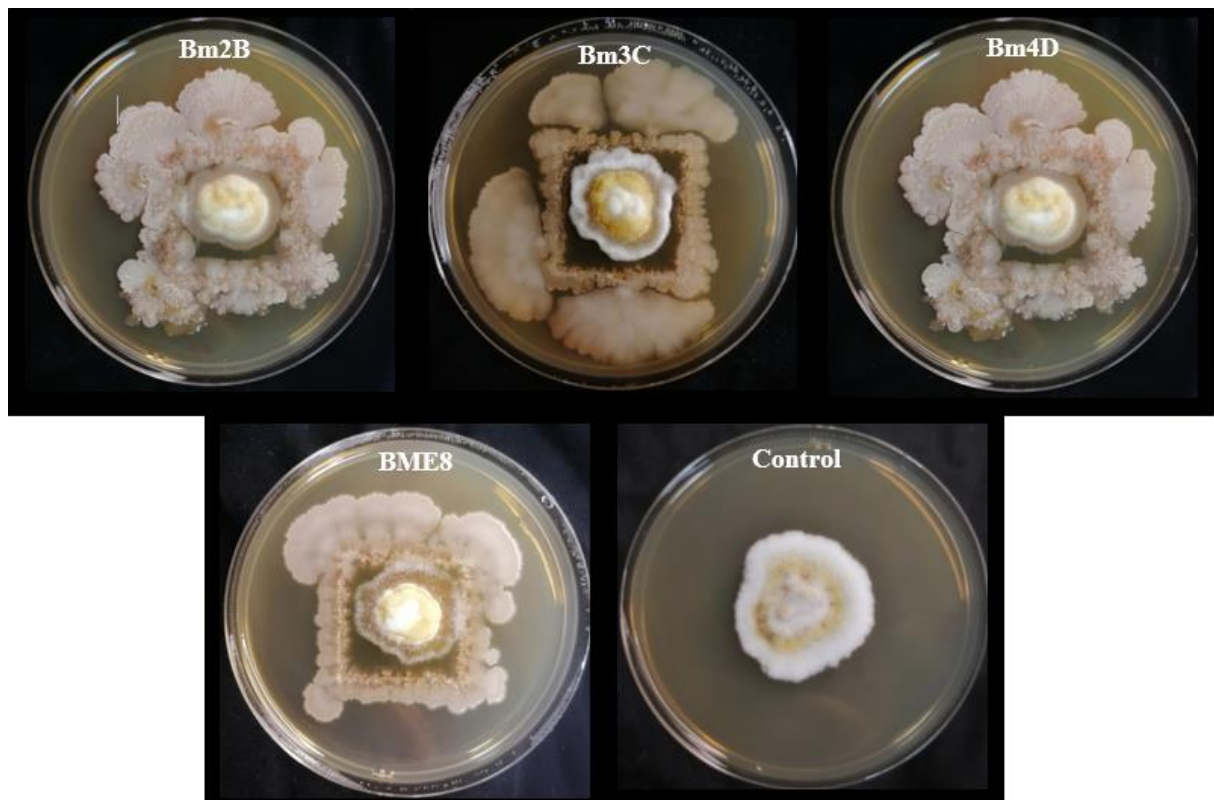
L'inhibition de la croissance des mycéliums fongiques et de la germination des spores est un mécanisme conventionnel des agents de lutte biologique pour le contrôle des maladies (Zhang et al., 2020). Ainsi, dans la présente investigation, l'effet inhibiteur des souches Bm1A, Bm2B, Bm3C, Bm4D et BME8 sur la croissance des mycéliums et la germination des conidies a été mis en évidence (figure 16).



**Figure 16** : Effet inhibiteur des souches étudiées contre *Alternaria solani*.

### 3. Effet inhibiteur des souches contre *Verticillium dahliae*

L'efficacité des cinq antagonistes bactériens a été testée contre le pathogène *Verticillium dahliae*. La capacité de ces bactéries à inhiber la croissance de *Verticillium dahliae* a été démontrée par les essais réalisés *in vitro* (figure 17).



**Figure 17** : Effet inhibiteur des souches étudiées contre *Verticillium dahliae*.

## **II. Effet antifongique des extraits des souches bactériennes isolées de la rhizosphère du cactus**

Les résultats de cette étude ont montré que tous les extraits des souches bactériennes isolées des racines du cactus ont montré une activité inhibitrice contre les 3 champignons étudiés (tableau X). Ceci montre que les souches agissent par des métabolites qui sont libérés dans le milieu extérieur.

**Tableau X :** Activité inhibitrice des extraits des souches étudiées contre les champignons phytopathogènes.

|             | <b>Inhibition</b>                   |                          |                             |
|-------------|-------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
|             | <i>Fusarium oxysporum albedinis</i> | <i>Alternaria solani</i> | <i>Verticillium dahliae</i> |
| <b>Bm1A</b> | +                                   | +                        | +                           |
| <b>Bm2B</b> | +                                   | +                        | +                           |
| <b>Bm3C</b> | +                                   | +                        | +                           |
| <b>Bm4D</b> | +                                   | +                        | +                           |
| <b>BmE8</b> | +                                   | +                        | +                           |

(+) présence d'inhibition

### III. Discussion

La pression des agents pathogènes est une cause majeure de perte de rendement dans les systèmes agricoles et un facteur important affectant la structure et la productivité des communautés végétales naturelles. Cependant, les bactéries antagonistes des agents pathogènes des plantes sont connues pour réduire l'infection des plantes. Ces bactéries ont été largement étudiées dans les systèmes agricoles où elles contribuent de manière significative à la suppression des agents phytopathogènes (Latz et al., 2012).

Dans ce travail, on a testé cinq souches bactériennes isolées des racines du cactus contre trois champignons phytopathogènes du cactus et d'autres cultures.

Pour *Fusarium oxysporum*, toutes les souches ont montré une bonne inhibition de la croissance mycélienne. Les souches Bm2B et BME8 identifiées comme *Sphingobium yanoikuyae* et *Bacillus halotolerans* ont montré le meilleur résultat avec une inhibition de 80,66% et 76,66% respectivement, suivies par *Bacillus subtilis* 75% et par *Bacillus licheniformis* 70,66%. Ceci peut être lié probablement aux sécrétions bactériennes d'antibiotiques ou des enzymes hydrolytiques, et/ou à la compétition pour les ressources nutritives avec ce champignon phytopathogène. L'ensemble de ces mécanismes agissant en synergie a été rapporté la cause de suppression des champignons phytopathogènes par *Bacillus spp.* En fait, de nombreuses

familles de PGPR, notamment *Bacillus sp.*, qui produit une grande variété de sidérophores, et les utilisaient comme moyen d'inhibition ou compétition (Nabti et al., 2013). Certaines bactéries produisent des chitinases, des 1,3-glucanases et des cellulases en plus des sidérophores. Dans le chapitre II de ce travail, la souche Bm2B ou *Sphingobium yanoikuyae* a été prouvée pour sa production de l'AIA et la cellulase, alors que la souche BME8 a été démontré une grande production des sidérophores et de la cellulase. Calvo et al., (2010) ont démontré que la cellulase est impliquée dans l'abolition de la croissance de *Phytophthora cactorum* en éliminant les oospores du mycélium. Liu et al., (2018) a identifié aussi d'autres composés isolés de *Bacillus subtilis* ayant de forts effets antifongiques, la 6-méthyl-2-heptanone, de l'acétophénone, du 2-pentylfurane, de la 2,5-diméthyl pyrazine et du benzothiazole. La 6-méthyl-2-heptanone produite par *B. subtilis* a complètement inhibé la croissance mycélienne de *F. oxysporum f. sp. Lactucae*. Le benzothiazole produit par les espèces de bacilles peut aussi inhiber la croissance de *F. oxysporum* (Raza et al., 2015). Une souche de *Bacillus halotolerans* MS 50-18A a été testé pour son effet antifongique par Sagredo-Beltrán et al., (2018). Cette souche contient le gène bacA qui code pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse de la bacilysine. Ce dernier est un dipeptide qui inhibe la glucosamine synthase qui provoque la lyse des cellules fongiques, cela pourrait expliquer la capacité de cette bactérie à inhiber les phytopathogènes fongiques (Sagredo-Beltrán et al., 2018). Kefi et al., (2015) a démontré que BT5 (*B. halotolerans*) produit la fengycine et la surfactine. Cependant, l'activité antifongique est principalement liée aux fengycines qui sont capables de créer des pores qui affectent considérablement la perméabilité de la membrane cellulaire (Deleu et al., 2005).

Le résultat a montré que le taux d'inhibition de la croissance d'*A. solani* par ces souches était de 84,31% à 74,01 % par rapport au témoin après 6 jours, suggérant que la souche Bm1A (*Bacillus subtilis*) et la souche Bm3C (*Priestia aryabhatai*) présentaient une forte activité inhibitrice sur la croissance des mycéliums fongiques d'*A. solani*. Latha et al., (2009) ont testé *Bacillus subtilis* pour l'inhibition de la croissance mycélienne d'*Alternaria solani*. Le résultat était la libération des substances antibiotiques comme le 2,4, le diacétylphloroglucinol, l'oligomycine, la phénazine, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine, la pyocyanine, l'iturine, la bacillomycine, la zwittermycine A et la surfactine.

De nombreuses autres études ont montré que les espèces de bacilles présentaient une forte activité antimicrobienne contre les champignons appartenant au genre *Alternaria* (Tozlu et al.,

2018). Les souches d'*A. alternata* qui ont été inoculées avec *B. subtilis* et *B. aryabhatai*. Par conséquent, une croissance mycélienne significativement moindre pendant la période d'incubation *in vitro* a été démontrée. Cette constatation concorde avec les rapports d'Abbo et al. (2014) qui ont indiqué la capacité de ces bactéries à inhiber la croissance mycélienne *in vitro* de nombreux champignons pathogènes des plantes. Récemment, Zhang et al., (2020) ont testé l'effet antifongique des substances volatiles produites par la souche *Bacillus subtilis* ZD01 contre *Alternaria solani* dans la pomme de terre. Les benzènes et les cétones sont les substances volatiles les plus abondantes produites par la souche ZD01. L'aniline et l'acétophénone, qui appartenaient à des composés benzéniques, pouvaient inhiber complètement la croissance d'*A. solani* à certaines concentrations. Leur présence aboutit à un rendement élevé, ainsi il est donc probable qu'il s'agit des principales substances volatiles qui jouent un rôle clé pendant le processus antifongique.

Concernant *Verticillium dahliae*, il a été mis en évidence qu'à l'exception de la souche Bm1A, les quatre bactéries ont démontré une activité inhibitrice sur la croissance du pathogène. Néanmoins, ce résultat ne corrobore pas autres études précédentes où d'autres souches de *Bacillus subtilis* ont été démontré capables d'éliminer *Verticillium dahliae* comme rapporté par (Berg et Ballin, 1994). Au contraire la souche Bm2B identifiée comme *Sphingobium yanoikuyae*, a pu réduire le développement du champignon à 47,48%. En fait, dans des études réalisés par Zhu et al., (2007), la production de chitinase et de chitosanase par *Sphingomonas sp* a été détectée. Ces deux enzymes de *Sphingomonas sp* sont assez stables et actifs et dégradent efficacement la chitine. En fait, la chitosanase qui pourrait dégrader le chitosane dans un mode spécifique a été utilisée dans la délivrance de gènes médiée par le chitosane, elle améliore l'expression des gènes par dégradation endocellulaire (Liang et al., 2006). Plusieurs recherches ont rapporté que l'activité antifongique *in vitro* de la chitosanase peut être utilisée pour améliorer la résistance des plantes contre différents champignons phytopathogènes (Gao et al., 2008; Kouzai et al., 2012). Tandis qu'une autre chitosanase issue de *Bacillus cereus* D11 était capable d'inhiber la croissance des hyphes de *Rhizoctonia solani* (Gao et al., 2008).

Alors que l'effet d'inhibition de toutes les bactéries évaluées était réduit envers *Verticillium dahliae* en comparaison à leur effet sur les autres champignons phytopathogènes testés. Ceci peut être expliqué par l'effet de biorésistance que démontrent certains champignons. En fait, Kouzai et coll. (2012) ont rapporté le mécanisme moléculaire de cette biorésistance. Incontestablement, les champignons phytopathogènes modifient leurs composants de la paroi cellulaire au cours du processus d'infection pour éviter la dégradation par les enzymes lytiques



de l'hôte. La conversion de la chitine de la paroi cellulaire en chitosane est susceptible d'être l'une des stratégies d'infection des agents pathogènes. Ainsi, l'introduction de l'activité de dégradation du chitosane dans les plantes devrait améliorer la résistance aux maladies fongiques (Thadathil et Velappan, 2014). Selon ces études, le gène *Chol*, de *Bacillus circulans* MH-K1 a exhibé une activité antifongique contre le champignon de l'explosion du riz *Magnaporthe oryzae*. L'introduction de ce gène a conféré une activité de chitosanase aux cellules de riz. Les plants de riz transgéniques exprimant *Chol* destiné à être localisé dans l'apoplaste ont montré une résistance accrue à *Magnaporthe oryzae*. Ainsi, nous prévoyons de mener des études pour vérifier l'activité antifongique intéressante de la chitosanase.

## **D. Récapitulation**

Les résultats de cette étude, montrent bien l'efficacité des souches *Bacillus subtilis* Bm1A, *Sphingobium yanoikuyae* Bm2B, *Priestia aryabhatai* Bm3C, *Bacillus licheniformis* Bm4D et *Bacillus halotolerans* BME8 pour l'inhibition des champignons pathogènes. Cette inhibition peut s'expliquer par la capacité de ces souches à produire des enzymes hydrolytiques dégradant la paroi cellulaire comme la lipase, la chitinae et la protéase. Les lipopeptides, y compris la surfactine, l'iturine et la fengycine, ont été décrits dans plusieurs études comme une classe majeure d'antimicrobiens peptidiques bacillaires, qui ont un grand potentiel pour les applications biotechnologiques et biopharmaceutiques.

# **Conclusion générale et perspectives**

Sous l'action combinée des maladies causées par des phytopathogènes, des attaques des ravageurs et de la concurrence des adventices, on estime que près de 50% de la production agricole mondiale est perdue avant ou après la récolte. Par ailleurs, dans tous les systèmes de culture où l'emploi des pesticides a été généralisé, la manifestation des dégâts a été constaté due à des ravageurs dont l'action n'avait pas été jusqu'alors mise en évidence. Aussi, avec le temps, même si certains pesticides ont démontré leur efficacité, on s'est aperçu, dans de nombreux cas, que pour obtenir un même résultat, il fallait augmenter chaque année la dose du produit utilisé jusqu'au jour où le ravageur devenait totalement insensible à ce pesticide.

Prenant aussi en considération les énormes risques que présentent ces produits pour l'environnement et la santé humaine, en particulier les insecticides et les fongicides, leur utilisation courante dans l'agriculture est également remise en question.

Alors que jusqu'à actuellement, pour lutter contre la cochenille du figuier de barbarie et des maladies cryptogamiques, les insecticides à côté des fongicides chimiques sont toujours les principales méthodes utilisées, en absence des recherches développées et des stratégies alternatives confirmées comme la lutte biologique.

Longtemps méconnus ou mal aimés, les micro-organismes en agriculture bénéficient aujourd'hui d'un regain d'intérêt. Ils accompagnent les plantes depuis leurs origines et sont maintenant reconnus comme partenaires d'intérêt agronomique. On les retrouve aussi bien dans la rhizosphère (zone proche des racines) que dans la phyllosphère (parties situées au-dessus du niveau du sol).

Certains micro-organismes possèdent des propriétés agronomiques réellement intéressantes pour leur plante-hôte. Les technologies actuelles nous permettent d'étudier ces mécanismes, sélectionner les micro-organismes d'intérêt agronomique, de les analyser et les formuler afin d'inoculer les cultures.

Ainsi, l'adoption des bactéries bénéfiques comme agents de lutte biologique offre des possibilités prometteuses pour une agronomie respectueuse de l'environnement. En plus d'être un bon compromis pour la sélection variétale dans la lutte contre les maladies, cette méthode se justifie par la nature omniprésente de ces micro-organismes à large spectre d'hôte. Par ailleurs, cela permet également d'utiliser moins d'agents phytosanitaires et fertilisants.

C'est dans ce contexte que l'objectif de cette thèse s'est inscrit qui vise à explorer le potentiel des souches bactériennes, isolées de la rhizosphère du cactus et à contrôler le grand ravageur du figuier de barbarie, *Dactylopius opuntiae*. Aussi, nous avons envisagé à déterminer performances de ces bactéries et à confirmer leurs intérêts agronomiques. Ainsi nous avons examiné leur capacité à surmonter des conditions de stress abiotiques, leurs traits PGPR et leurs effets inhibiteurs contre quatre champignons phytopathogènes les plus connus dans l'agriculture.

Ainsi, parmi 62 souches bactériennes isolées, nous avons validé une grande performance de cinq isolats de lutter contre les cochenilles. Selon, une identification moléculaire à l'aide de l'ARNr 16S, ces souches sont *Bacillus subtilis* (Bm1A), *Sphingobium yanoikuyae* (Bm2B), *Priestia aryabhatai* (Bm3C), *Bacillus licheniformis* (Bm4D), et *Bacillus halotolerans* (BME8).

En premier lieu, nous avons examiné la capacité de ces souches à tolérer le stress salin, hydrique et climatiques, en tant qu'indicateurs de performance les plus requis dans des conditions arides et le défi auquel notre pays et le monde en général ont été confrontés ces dernières années. Toutes ces souches sont des Gram+ et supportent des conditions de stress jusqu'à 12% de sels, une température qui peut aller à plus de  $T^{\circ} > 50^{\circ}\text{C}$ , surmontent un stress hydrique jusqu'à 25%, à l'exception de la souche Bm2B identifiée comme *Sphingobium yanoikuyae*, une bactérie à Gram négatif, qui était sensible à certains niveaux de stress abiotique.

Ainsi, nous avons testé l'efficacité des 4 souches les plus puissantes sur le bio-contrôle de la cochenille *in vivo* et *in vitro*. Les résultats soutirés démontrent que les indicateurs de performance de cette lutte varient en fonction de la souche bactérienne impliquée, du stade de vie de l'insecte et à l'état larvaire ou adulte. Aussi les activités observées *in vivo* étaient plus ou moins variables par rapport à ceux obtenus *in vitro*. Ce constat est lié encore à l'effet de chacune des souches sur la biodégradation ou l'hémolyse de la cire protectrice de l'insecte.

Les tests ont démontré que la souche *Bacillus halotolerans* (BME8) conduit à la létalité des femelles adultes et des larves de 100 % à faible concentration  $10^5 \text{ CFU.mL}^{-1}$  en 24 h, en plus de son potentiel de dégradation des filaments cireux protecteurs. Aussi, cette souche a conféré le taux de mortalité de cochenille le plus élevée en serre (à 5 mg/ml). Alors que, la souche *Priestia aryabhatai* (Bm3C) était la plus rapide en laboratoire, aboutissant à la létalité de 100 % à  $10^7 \text{ CFU.mL}^{-1}$  dans un temps très court 12 h. En revanche, *Bacillus licheniformis* (Bm4D)

a montré une toxicité modérée pour les femelles adultes et les larves en laboratoire, mais une activité importante dans l'hémolyse de la cire dans quelques minutes en serre. Alors que, l'application de la souche *Bacillus subtilis* (Bm1A) a aussi efficacement hémolysé la cire de couverture de l'insecte. En fait, malgré son efficacité modérée dans les expériences en laboratoire, elle était le second traitement le plus efficace en serre avec un taux de survie de 55% à  $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>, démontrant ainsi son pouvoir de dégradation de la cire hydrophobe protectrice des femelles de cochenille.

Par ailleurs, afin de confirmer cet effet biopesticide, nous avons vérifié le potentiel antagoniste de ces souches contre trois champignons phytopathogènes les plus courants en agriculture. Ainsi, les isolats ont été cultivés en double culture avec des agents pathogènes fongiques des plantes. Ces champignons phytopathogènes sont *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, et *Verticillium dahliae*. Les expérimentations réalisées démontrent que toutes les souches bactériennes, ont pu inhiber significativement la croissance des pathogènes fongiques, sauf pour *Verticillium dahliae*, en moins de 6 jours, avec un pourcentage d'inhibition allant de 70 à 87,57 %. Tandis que l'inhibition de *Verticillium dahliae*, était moins sévère avec un pourcentage allant de 23,90 à 47,48 % en fonction de la souche bactérienne utilisée. En fait, l'effet d'inhibition peut s'expliquer par plusieurs mécanismes liés soit aux sécrétions bactériennes d'antifongiques ou des enzymes hydrolytiques, et/ou à la compétition pour les ressources nutritives avec ces champignons phytopathogènes. Nabti et al., (2013) ont rapporté que de nombreuses familles de PGPR, notamment *Bacillus sp.*, produisent une grande variété de sidérophores, et les utilisent comme moyen d'inhibition ou compétition. Effectivement, nous avons démontré la capacité de nos 4 souches à produire des sidérophores. Ce sont des peptides qui jouent aussi un rôle important dans la mobilisation du fer pour le rendre disponible aux plantes. Par ailleurs, Calvo et al., (2010) ont démontré l'effet de la cellulase dans l'abolition de la croissance de *Phytophthora cactorum* en éliminant les oospores du mycélium. En fait, la dégradation des parois cellulaires fongiques avec la production d'enzymes hydrolytiques d'isolats bactériens est l'un des mécanismes les plus importants pour le biocontrôle des champignons pathogènes (Elshafie et al. 2012). Dans le chapitre II, nous avons démontré la production des enzymes hydrolytiques surtout la cellulase par les 4 souches et principalement par les deux souches *Bacillus subtilis* (Bm1A) et *Bacillus licheniformis* (Bm4D). La cellulase est une enzyme capable de défaire les composants de la paroi cellulaire fongique entraînant ainsi la lyse cellulaire (El-Hamshary et al., 2008). Torres et al., (2016) rapportent que les bactéries utilisent cette enzyme dans les phénomènes de compétition pour les nutriments.

Par ailleurs, selon plusieurs recherches, l'activité antifongique et insecticide des bactéries est liée généralement à la production des lipopeptides, notamment la surfactine, l'iturine, la bacillomycine, la fengycine, la lichenysine et d'autres composés (Ghribi et al., 2012; Mounia et al. 2014). Ongena et al. (2005), suggèrent que les lipopeptides sont responsables de la majeure partie de l'activité antifongique développée *in vitro* par *Bacillus subtilis* envers de multiples agents pathogènes des plantes.

En fait, les analyses de l'HPLC réalisées par Favaro et al. (2016) sur les substances bioactives sécrétés par la souche *Bacillus licheniformis* ont détecté la présence d'isomères linéaires de lichénysines et de surfactines. Wu et al., (2021) ont aussi remarqué que la souche de *Bacillus halotolerans* KKD1 contenait de la surfactine et de la fengycine. Tsalgatidou et al. (2022) a également indiqué que la souche *Bacillus halotolerans* Cal.1.30 synthétise et sécrète les lipopeptides, la fengycine, la surfactine et le mojavensis A à côté des isoformes des bacillaènes, l'anticapsine L-dihydro et la bacillibactine.

Par rapport à d'autres critères de performances agronomiques, notre souche *Bacillus halotolerans* (BME8), a démontré des traits PGPRs intéressantes et une grande tolérance aux conditions de stress abiotique en plus de son effet biopesticide sur la cochenille et les champignons phytopathogènes. De plus, cette souche a démontré un pouvoir de solubilisation de Zn. Ce dernier est un élément important parmi les minéraux, où la recherche des bactéries qui solubilisent le Zn est devenue une priorité en raison de sa nécessité pour le corps humain et de son manque chez les plantes.

La souche Bm1A, identifiée comme *Bacillus subtilis* a aussi démontré sa capacité à tuer les insectes de cochenille à côté de l'hémolyse de la cire protectrice. En plus, elle s'est montrée comme la plus active en termes de protection contre *Alternaria solani*. Quand à la souche Bm2B (*Sphingobium yanoikuyae*) est la seule qui possède la capacité à produire une quantité élevée d'IAA, ce qui est suffisant pour stimuler la croissance des plantes, et la seule à côté de la souche BME8 qui a pu solubiliser le Zn. Tandis que la souche Bm3C (*Priestia aryabhatai*) nommée avant comme *Bacillus aryabhatai*, a pu contrôler les cochenilles, mais malheureusement son utilisation sur des femelles recouvertes de la cire n'a pas donné de bons résultats. En revanche, et comme les autres souches, elle a pu inhiber la croissance des champignons phytopathogènes. Finalement, la souche Bm4D identifiée comme *Bacillus licheniformis*, a montré un bon potentiel de dégradation de la cire protectrice, ceci, peut mener à l'utilisation de cette souche

en consortium avec la souche *Priestia aryabhatai* (Bm3C) pour renforcer leur pouvoir à contrôler la cochenille dans le champ. Les trois souches *Bacillus Subtilis*, *Priestia aryabhatai*, et *Bacillus halotolerans* ont démontré aussi leur pouvoir de fixation de l'azote atmosphérique et un pouvoir de solubilisation du P en milieu PVK (indice de solubilisation entre 2,12-1,83).

Ainsi, ces souches bactériennes ayant une activité inhibitrice contre les agents pathogènes des cultures et qui sont capables d'établir des interactions amicales avec les plantes hôtes des mêmes cultures pourraient offrir plus de possibilités de faire face aux phytopathogènes. Les résultats de nos études ouvrent la voie à de nouvelles recherches dans le domaine des interactions plantes-microbes conduisant à l'identification des voies biochimiques déclenchées par les souches non pathogènes.

Par ailleurs, comme perspectives de ce travail, nous envisageons la formulation des consortiums composés par ces quatre souches pour évaluer leur effet synergique face à l'optimisation des deux critères biopesticide et PGPR.

Dans l'avenir aussi, il serait particulièrement important de déterminer plus précisément quels sont les composés peptidiques ou lipopeptidiques responsables de ces activités antagonistes chez ces souches. En outre, des études devraient être menées sur la mise au point de méthodes facilitant l'application par les agriculteurs de ces souches et/ou de leurs extraits contenant de substances biologiquement actives à utiliser comme traitement préventif ou curatif.

Finalement, puisque ces souches ont montré leur pouvoir de solubilisation des minéraux et production des enzymes importants pour la croissance des plantes, de ce fait, des tests sur l'inoculation des plantes du figuier de barbarie avec ces souches individuellement ou en consortium peuvent être faites pour voir si ces microorganismes vont favoriser l'immunité des plantes contre ces ravageurs.

# Références

## A

Abbo A Z, Idris M O and Hammad A M. 2014. The antifungal effects of four tomato rhizosphere *Bacillus* spp. Against *Alternaria alternata*. *International Journal of Science and Research* 3(7): 1324–8.

Abdel-Hameed, E.-S.S., Nagaty, M.A., Salman, M.S., Bazaid, S.A., 2014. Phytochemicals, nutritionals and antioxidant properties of two prickly pear cactus cultivars (*Opuntia ficus indica* Mill.) growing in Taif, KSA. *Food Chem.* 160, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.060>

Al-Lahham, S., Sbieh, R., Jaradat, N., Almasri, M., Mosa, A., Hamayel, A., Hammad, F., 2020. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of four different extracts derived from the roots of *Nicotiana tabacum* L. *Eur. J. Integr. Med.* 33, 101039. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2019.101039>

Alori, E.T., Glick, B.R., Babalola, O.O., 2017. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology* 8.

Antil, S., Kumar, R., Pathak, D.V., Kumar, A., Panwar, A., Kumari, A., Kumar, V., 2021. On the potential of *Bacillus aryabhatai* KMT-4 against *Meloidogyne javanica*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 31, 67. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00417-2>

APEDA (2016) Regulation of export of fresh grapes from India through monitoring of pesticide residues: annexure 5. List of chemicals with CIB&RC label claim for use in grapes. Available from <http://apeda.gov.in/apedawebsite/Grapenet/procedureforexportofgrapes2016-17.pdf>. Accessed Jan 2017

Approches de mise en œuvre des deux piliers du PMV, 2014. URL <https://www.ada.gov.ma/fr/approches-de-mise-en-oeuvre-des-deux-piliers-du-pmv> (accessed 6.7.22).

Aragona M, Lauriano ER, Pergolizzi S, Faggio C. *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller as a source of bioactivity compounds for health and nutrition. 2018. *Nat Prod Res.* 32(17): 2037-2049. doi: 10.1080/14786419.2017.1365073.

Aruwa, C.E., Amoo, S.O., Kudanga, T., 2018. *Opuntia* (Cactaceae) plant compounds, biological activities and prospects – A comprehensive review. *Food Res. Int.* 112, 328–344. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.047>



## B

- Babcock, J.M., Gerwick, C.B., Huang, J.X., Loso, M.R., Nakamura, G., Nolting, S.P., Rogers, R.B., Sparks, T.C., Thomas, J., Watson, G.B., Zhu, Y., 2011. Biological characterization of sulfoxaflor, a novel insecticide. *Pest Manag. Sci.* 67, 328–334. <https://doi.org/10.1002/ps.2069>
- Babu, T.R., Azam, K.M., 1987. Biology of *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant [Coccinellidae: Coleoptera] in relation with temperature. *Entomophaga* 32, 381–386. <https://doi.org/10.1007/BF02372447>
- Badii, M.H., Flores, A.E., 2001. PRICKLY PEAR CACTI PESTS AND THEIR CONTROL IN MEXICO. *Fla. Entomol.* 503.
- Barguigua Abouddihaj, Zahir Ilham, Fikri Nadia, Youss Saadia, Youss Bochra (2021). Prevalence of olive tree phytopathologies of microbial origin in Fquih Ben Salah, Azilal and Beni Mellal (Morocco). *Journal of Analytical Sciences and Applied Biotechnology.* 3 (1): 48-55. DOI: 10.48402/IMIST.PRSM/jasab-v3i1.28239.
- Barr Dana B., Angerer Jürgen, 2006. Potential Uses of Biomonitoring Data: A Case Study Using the Organophosphorus Pesticides Chlorpyrifos and Malathion. *Environ. Health Perspect.* 114, 1763–1769. <https://doi.org/10.1289/ehp.9062>
- Ben Khedher, S., Mejdoub-Trabelsi, B., Tounsi, S., 2021. Biological potential of *Bacillus subtilis* V26 for the control of *Fusarium* wilt and tuber dry rot on potato caused by *Fusarium* species and the promotion of plant growth. *Biological Control* 152, 104444. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104444>
- Berg, G., Ballin, G., 1994. Bacterial Antagonists to *Verticillium dahliae* Kleb. *Journal of Phytopathology* 141, 99–110. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1994.tb01449.x>
- Berger, S., Sinha, A.K., Roitsch, T., 2007. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* 58, 4019–4026. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm298>
- Bhat, R.G., Subbarao, K.V., 1999. Host Range Specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*® 89, 1218–1225. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.12.1218>
- Binod, P., Sukumaran, R. k., Shirke, S. v., Rajput, J. c., Pandey, A., 2007. Evaluation of fungal culture filtrate containing chitinase as a biocontrol agent against *Helicoverpa armigera*. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1845–1852. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03428.x>
- Bishop, C.D., Cooper, R.M., 1983. An ultrastructural study of vascular colonization in three vascular wilt diseases I. Colonization of susceptible cultivars. *Physiological Plant Pathology* 23, 323–343. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(83\)90018-8](https://doi.org/10.1016/0048-4059(83)90018-8)

Boonmahome, P., Mongkolthanaruk, W., 2013. Lipase-Producing Bacterium and its Enzyme Characterization. JOLST 196–200. <https://doi.org/10.12720/jolst.1.4.196-200>

Borges, L.R., Santos, D.C., Cavalcanti, V.A.L.B., Gomes, E.W.F., Falcão, H.M., da Silva, D.M.P., 2013a. SELECTION OF CACTUS PEAR CLONES REGARDING RESISTANCE TO CARMINE COCHINEAL DACTYLOPIUS OPUNTIAE (DACTYLOPIIDAE). Acta Hortic. 359–365. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.995.47>

Borges, L.R., Santos, D.C., Gomes, E.W.F., Cavalcanti, V.A.L.B., Silva, I.M.M., Falcão, H., Silva, D.M.P., 2013b. Use of biodegradable products for the control of dactylopius opuntiae (hemiptera: Dactylopiidae) in cactus pear. Acta Hortic. 995, 379–386. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.995.49>

Boonmahome, P., Mongkolthanaruk, W., 2013. Lipase-Producing Bacterium and its Enzyme Characterization. JOLST 196–200. <https://doi.org/10.12720/jolst.1.4.196-200>

Bouaouine, O., Bourven, I., Khalil, F., Baudu, M., 2018. Identification of functional groups of *Opuntia ficus-indica* involved in coagulation process after its active part extraction. Environ. Sci. Pollut. Res. 25, 11111–11119. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1394-7>

Bouharroud, R., Amarraque, A., Qessaoui, R., 2016. First report of the *Opuntia cochineal* scale *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) in Morocco. EPPO Bull. 46, 308–310. <https://doi.org/10.1111/epp.12298>

Bouharroud, R., Sbaghi, M., Boujghagh, M., El Bouhssini, M., 2018. Biological control of the prickly pear cochineal *Dactylopius opuntiae* Cockerell (Hemiptera: Dactylopiidae) - Bouharroud - 2018 - EPPO Bulletin - Wiley Online Library [WWW Document]. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/epp.12471> (accessed 12.21.19).

## C

Calvo, P., Ormeño-Orrillo, E., Martínez-Romero, E., Zúñiga, D., 2010. Characterization of *Bacillus* isolates of potato rhizosphere from andean soils of Peru and their potential PGPR characteristics. Braz. J. Microbiol. 41, 899–906. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400008>

Cappuccino JG, Sherman N. Biochemical activities of microorganisms. In: Microbiology, a laboratory manual. 1st ed. California: The Benjamin/Cummings PublishingCo; 1992. p. 105–300.

Castellano Hinojosa A and Bedmar E (2017) Methods for evaluating plant growth-promoting rhizobacteria traits.

Ceci L and Loranzo J. Determination of enzymatic activities of commercial pectinases for the clarification of apple juice. Food Chemistry, 2008; 61: 237-241.

Chaves, T.P., Fernandes, F.H.A., Santana, C.P., Santos, J.S., Medeiros, F.D., Felismino, D.C., Santos, V.L., Catão, R.M.R., Coutinho, H.D.M., Medeiros, A.C.D., 2016. Evaluation of the

Interaction between the *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz Extract and Antimicrobials Using Biological and Analytical Models. PLOS ONE 11, e0155532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155532>

Chavez-Moreno, C.K., Tecante, A., Casas, A., 2009. The *Opuntia* (Cactaceae) and *Dactylopius* (Hemiptera: Coreidae) of use, interaction and distribution. *Biodivers Conserv* 3337–3355. <https://doi.org/10.1007/s10531-009-9647-x>

Chiasson, H., Bostanian, N.J., Vincent, C., 2004a. Acaricidal Properties of a *Chenopodium*-Based Botanical. *J. Econ. Entomol.* 97, 1373–1377. <https://doi.org/10.1093/jee/97.4.1373>

Chiasson, H., Vincent, C., Bostanian, N.J., 2004b. Insecticidal Properties of a *Chenopodium*-Based Botanical. *J. Econ. Entomol.* 97, 1378–1383. <https://doi.org/10.1093/jee/97.4.1378>

Choi, H.-S., 2006. Lipolytic Effects of Citrus Peel Oils and Their Components. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3254–3258. <https://doi.org/10.1021/jf052409j>

Coria Cayupán, Y.S., Ochoa, M.J., Nazareno, M.A., 2011. Health-promoting substances and antioxidant properties of *Opuntia* sp. fruits. Changes in bioactive-compound contents during ripening process. *Food Chem.* 126, 514–519. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.033>

Cruz-Rodríguez, J.A., González-Machorro, E., Villegas González, A.A., Rodríguez Ramírez, M.L., Mejía Lara, F., 2016. Autonomous Biological Control of *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) in a Prickly Pear Plantation With Ecological Management. *Environ. Entomol.* 45, 642–648. <https://doi.org/10.1093/ee/nvw023>

## D

Dar, Showket A., Bashir A. Rather, and Ajaz A. Kandoo. "Insect pest management by entomopathogenic fungi." *J. Entomol. Zool. Stud* 5 (2017): 1185-1190.

Das, K., Katiyar, V., Goel, R., 2003. 'P' solubilization potential of plant growth promoting *Pseudomonas* mutants at low temperature. *Microbiological Research* 158, 359–362. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00217>

da Silva Santos, A.C., Oliveira, R.L.S., da Costa, A.F., Tiago, P.V., de Oliveira, N.T., 2016. Controlling *Dactylopius opuntiae* with *Fusarium incarnatum*–*equiseti* species complex and extracts of *Ricinus communis* and *Poincianella pyramidalis*. *J. Pest Sci.* 89, 539–547. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0689-4>

De Oliveira, C.T., Pellenz, L., Pereira, J.Q., Brandelli, A., Daroit, D.J., 2016. Screening of Bacteria for Protease Production and Feather Degradation. *Waste Biomass Valor* 7, 447–453. <https://doi.org/10.1007/s12649-015-9464-2>

Deleu, M., Paquot, M., Nylander, T., 2005. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface-implications for the effect of fengycin on biological membranes. *J Colloid Interface Sci* 283, 358–365. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.09.036>

Diniz, A., Barbosa, L., Santos, A.C., Oliveira, N., Félix, A., Carneiro-Leão, M., Tiago, P., 2020. Bio-insecticide effect of isolates of *Fusarium caatingaense* (Sordariomycetes: Hypocreales) combined to botanical extracts against *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 1–12. <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1720601>

Diniz, A.G., Felipe, L., Barbosa, S., Carla, A., Oliveira, N.T. De, Félix, A., Porto, M., Tiago, P.V., Gonçalves, A., Felipe, L., Barbosa, S., Carla, A., Oliveira, N.T. De, Félix, A., Carneiro-leão, M.P., 2020. Bio-insecticide effect of isolates of *Fusarium caatingaense* (Sordariomycetes : Hypocreales ) combined to botanical extracts against *Dactylopius opuntiae* ( Hemiptera : Dactylopiidae ). *Biocontrol Sci. Technol.* 0, 1–12. <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1720601>

Driesche, R.G., Bellows, T.S., 1996. *Biological control*. Chapman and Hall, New York.

Driss, F., Kallassy-Awad, M., Zouari, N., Jaoua, S., 2005. Molecular characterization of a novel chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Journal of Applied Microbiology* 99, 945–953. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02639.x>

## E

Eisner, T., Ziegler, R., McCormick, J.L., Eisner, M., Hoebeke, E.R., Meinwald, J., 1994. Defensive use of an acquired substance (carminic acid) by predaceous insect larvae. *Experientia* 50, 610–615. <https://doi.org/10.1007/BF01921733>

Elakhdar, I., Elsakhawy, T., Abokoura, H., 2020. Alleviation of Salt Stress on Wheat (*Triticum aestivum* L.) by Plant Growth Promoting Bacteria strains *Bacillus halotolerans* MSR-H4 and *Lelliottia amnigena* MSR-M49.

El Kharrassi, Y., Mazri, M.A., Benyahia, H., Benaouda, H., Nasser, B., El Mzouri, E.H., 2016. Fruit and juice characteristics of 30 accessions of two cactus pear species (*Opuntia ficus indica* and *Opuntia megacantha*) from different regions of Morocco. *LWT - Food Sci. Technol.* 65, 610–617. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.044>

El-Mostafa, K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbaj, M.S., Latruffe, N., Lizard, G., Nasser, B., Cherkaoui-Malki, M., 2014. Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a Source of Bioactive Compounds for Nutrition, Health and Disease. *Molecules* 19, 14879–14901. <https://doi.org/10.3390/molecules190914879>

Essoukrati, Y., Tahrouch, S., Hatimi, A., Gharby, S., Bouzoubaa, Z., Harhar, H., 2014. Phytochemical study of prickly pear from southern Morocco. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.09.002>

Etemadzadeh, S.S., Emtiazi, G., 2021. In vitro identification of antimicrobial hemolytic lipopeptide from halotolerant *Bacillus* by Zymogram, FTIR, and GC mass analysis. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 24, 666. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2021.53419.12022>

Eto, M., Tawata, K., Sakamoto, K., Oshima, K., 1978. Novel insecticidal five-membered cyclic phosphoramidothionates derived from l-amino acids. 日本農薬学会誌 (Journal of Pesticide Science) 3, 161–163. <https://doi.org/10.1584/jpestics.3.161>

## F

Fahsi, N., Mahdi, I., Mesfioui, A., Biskri, L., Allaoui, A., 2021. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Isolated from the Jujube (*Ziziphus lotus*) Plant Enhance Wheat Growth, Zn Uptake, and Heavy Metal Tolerance. *Agriculture* 11, 316. <https://doi.org/10.3390/agriculture11040316>

FAO, 2006. La Situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture 2006 [WWW Document]. URL <https://www.fao.org/3/a0800f/a0800f00.htm> (accessed 6.7.22).

Favaro, G., Bogialli, S., Di Gangi, I.M., Nigris, S., Baldan, E., Squartini, A., Pastore, P., Baldan, B., 2016. Characterization of lipopeptides produced by *Bacillus licheniformis* using liquid chromatography with accurate tandem mass spectrometry: Characterization of lipopeptides produced by *B. licheniformis*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 30, 2237–2252. <https://doi.org/10.1002/rcm.7705>

Feugang, J.M., Konarski, P., Zou, D., Stintzing, F.C., Zou, C., 2006. Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 11, 2574–2589. <https://doi.org/10.2741/1992>

Flores, A., Olvera, H., Rodríguez, S., Barranco, J., 2013. Predation Potential of *Chilocorus cacti* (Coleoptera: Coccinellidae) to the Prickly Pear Cacti Pest *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae). *Neotrop. Entomol.* 42, 407–411. <https://doi.org/10.1007/s13744-013-0139-z>

Franche, C., Lindström, K., Elmerich, C., 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* 321, 35–59. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8>

Fritz, M., Jakobsen, I., Lyngkjær, M.F., Thordal-Christensen, H., Pons-Kühnemann, J., 2006. Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza* 16, 413–419. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0051-z>

## G

Gadoury, D.M., Cadle-Davidson, L., Wilcox, W.F., Dry, I.B., Seem, R.C., Milgroom, M.G., 2012. Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular Plant Pathology* 13, 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00728.x>

Gao, X.-A., Ju, W.-T., Jung, W.-J., Park, R.-D., 2008. Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus cereus* D-11. *Carbohydrate Polymers* 72, 513–520. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.09.025>

Ghribi, D., Elleuch, M., Abdelkefi, L., Ellouze-Chaabouni, S., 2012. Evaluation of larvicidal potency of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant against *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae and influence of abiotic factors on its insecticidal activity. *Journal of Stored Products Research* 48, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2011.10.002>

Gordon, T.R., Martyn, R., 1997. The Evolutionary Biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual review of phytopathology* 35, 111–28. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.35.1.111>

Gul, A., Hussain, G., Iqbal, A., Rao, A.Q., Din, S. ud, Yasmeen, A., Shahid, N., Ahad, A., Latif, A., Azam, S., Samiullah, T.R., Hassan, S., Shahid, A.A., Husnain, T., 2020. Constitutive expression of Asparaginase in *Gossypium hirsutum* triggers insecticidal activity against *Bemisia tabaci*. *Sci Rep* 10, 8958. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65249-w>

## H

Hashem, A., Tabassum, B., Fathi Abd\_Allah, E., 2019. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences* 26, 1291–1297. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>

He, L.-M., Troiano, J., Wang, A., Goh, K., 2008. Environmental Chemistry, Ecotoxicity, and Fate of Lambda-Cyhalothrin, in: Whitacre, D.M. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer, New York, NY, pp. 71–91. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-77030-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-0-387-77030-7_3)

Hiremath, G., 2012. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF NITROGEN FIXING BACILLUS SUBTILIS STRAIN AS-4 FROM AGRICULTURAL SOIL. *International Journal of Recent Scientific Research* 3, 762–765.

Hoffmann, G.M., Nienhaus, F., Schönbeck, F., Weltzien, H.C., Wilbert, H., 1994. *Lehrbuch der Phytomedizin*. Blackwell Wissenschafts Verlag, Berlin.

Hu XF, Chen J, Guo JF. Two phosphate-and potassium-solubilizing bacteria iso-lated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. *World J Microb Biotechnol*2006;22:983–90

## I

Idris, I., Elkhouri, S., Bakri, Y., 2019. Evaluation of crude enzyme produced by *Bacillus subtilis* sy134d culture as a biocontrol agent against *Dactylopius opuntiae* (Dactylopiidae: Hemiptera) on

cactus pear | Semantic Scholar. URL <https://www.semanticscholar.org/paper/EVALUATION-OF-CRUDE-ENZYME-PRODUCED-BY-BACILLUS-AS/f243e5a3e1cd06a18f6b7213d6489f80491da9b7> (accessed 8.21.20).

Inglese, P., Mondragon, C., Nefzaoui, A., Saenz, C., 2017. Crop ecology, cultivation and uses of cactus pear. *Crop Ecol. Cultiv. Uses Cactus Pear*.

INRAE. URL <http://ephytia.inra.fr/fr/C/6091/Vigne-Oidium-Erysiphe-necator> (accessed 6.13.22).

Isaac, I., Harrison, J. a. C., 1968. The symptoms and causal agents of early-dying disease (Verticillium wilt) of potatoes. *Annals of Applied Biology* 61, 231–244. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1968.tb04528.x>

Iturriaga, L., Nazareno, M., 2016. Functional Components and Medicinal Properties of Cactus Products, in: Kristbergsson, K., Ötles, S. (Eds.), *Functional Properties of Traditional Foods, Integrating Food Science and Engineering Knowledge Into the Food Chain*. Springer US, Boston, MA, pp. 251–269. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7662-8\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7662-8_18)

## J

Jena, J., Gupta, A.K., 2012. RICINUS COMMUNIS LINN: A PHYTOPHARMACOLOGICAL REVIEW 4, 6.

## K

Katbeh Bader. M, Abu-Alloush, A., 2018. First Record of the Cochineal Scale Insect, *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Dactylopiidae), in Jordan. *Database*. <https://doi.org/10.1093/database/bav118>

Kaur, K., Dattajirao, V., Shrivastava, V., Bhardwaj, U., 2012. Isolation and Characterization of Chitosan-Producing Bacteria from Beaches of Chennai, India. *Enzyme Research* 2012, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2012/421683>

Kefi, A., Slimene, I.B., Karkouch, I., Rihouey, C., Azaeiz, S., Bejaoui, M., Belaid, R., Cosette, P., Jouenne, T., Limam, F., 2015. Characterization of endophytic *Bacillus* strains from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) displaying antifungal activity against *Botrytis cinerea* Pers. *World J Microbiol Biotechnol* 31, 1967–1976. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1943-x>

Ker, R.F., 1977. Investigation of locust cuticle using the insecticide diflubenzuron. *J. Insect Physiol.* 23, 39–48. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(77\)90107-X](https://doi.org/10.1016/0022-1910(77)90107-X)

Khanghahi, M.Y., Ricciuti, P., Allegretta, I., Terzano, R., Crecchio, C., 2018. Solubilization of insoluble zinc compounds by zinc solubilizing bacteria (ZSB) and optimization of their growth

conditions. *Environ Sci Pollut Res* 25, 25862–25868. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2638-2>

Khémiri I, Bitri L. 2019. Effectiveness of *Opuntia ficus indica* L. *inermis* Seed Oil in the Protection and the Healing of Experimentally Induced Gastric Mucosa Ulcer. *Oxid Med Cell Longev*. 1568720. doi: 10.1155/2019/1568720.

Kouzai, Y., Mochizuki, S., Saito, A., Ando, A., Minami, E., Nishizawa, Y., 2012. Expression of a bacterial chitosanase in rice plants improves disease resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell Rep* 31, 629–636. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1179-7>

Kumar, R., Kumar, V., 2018. A review of phylogeography: biotic and abiotic factors. *Geology, Ecology, and Landscapes* 2, 268–274. <https://doi.org/10.1080/24749508.2018.1452486>

Kunova, A., Bonaldi, M., Saracchi, M., Pizzatti, C., Chen, X., Cortesi, P., 2016. Selection of *Streptomyces* against soil borne fungal pathogens by a standardized dual culture assay and evaluation of their effects on seed germination and plant growth. *BMC Microbiol* 16, 272. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0886-1>

## L

Latha, P., Anand, T., Ragupathi, N., Prakasam, V., Samiyappan, R., 2009. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. *Biological Control* 50, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.03.002>

Li, T.X., Chen, Y., Liu, H.F., Ma, C.Y., Yang, W., 2021. Vectorizing Pro-Insecticide: Influence of Linker Length on Insecticidal Activity and Phloem Mobility of New Tralopyril Derivatives. *Molecules* 26, 4570. <https://doi.org/10.3390/molecules26154570>

Liang, D.C., Liu, W.G., Zuo, A.J., Sun, S.J., Cheng, N., Guo, G., Zhang, J.Y., De Yao, K., 2006. Pre-deliver chitosanase to cells: A novel strategy to improve gene expression by endocellular degradation-induced vector unpacking. *International Journal of Pharmaceutics* 314, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.01.044>

Lichtenberg, S., Huber-Sannwald, E., Nehren, U., Reyes-Agüero, J.A., 2019. Use and Conservation of the Threatened Brazilian National Tree *Paubrasilia echinata* Lam.: A Potential for Rio de Janeiro State?, in: Nehren, U., Schlüter, S., Raedig, C., Sattler, D., Hissa, H. (Eds.), *Strategies and Tools for a Sustainable Rural Rio de Janeiro*, Springer Series on Environmental Management. Springer International Publishing, Cham, pp. 205–219. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-89644-1\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-89644-1_14)



Liu, C., Yin, X., Wang, Q., Peng, Y., Ma, Y., Liu, P., Shi, J., 2018. Antagonistic activities of volatiles produced by two *Bacillus* strains against *Monilinia fructicola* in peach fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98, 5756–5763. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9125>

Lopes, R.S., Luciana G., O., Costa, A.F., Correia, M.T.S., Lima, E.A.L.-A., Lima, V.L.M., 2018. Efficacy of *Libidibia ferrea* var. *ferrea* and *Agave sisalana* Extracts against *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Coccoidea) [WWW Document]. ResearchGate. <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v10n4p255>

Louden BC, Haarmann D, & Lynne AM (2011) Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *Journal of Microbiology & Biology Education: JMBE*, 12(1), 51–53. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v12i1.249>

Luna, M.S.M., de Paula, R.A., Brandão Costa, R.M.P., dos Anjos, J.V., da Silva, M.V., Correia, M.T.S., 2020. Bioprospection of *Libidibia ferrea* var. *ferrea*: Phytochemical properties and antibacterial activity. *South Afr. J. Bot.* 130, 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.12.013>

## M

Maget-Dana R, Thimon L, Peypoux F, Ptack M (1992). Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A *Biochimie* 74:1047-1051.

Mahmood, I., Imadi, S.R., Shazadi, K., Gul, A., Hakeem, K.R., 2016. Effects of Pesticides on Environment, in: Hakeem, K.R., Akhtar, M.S., Abdullah, S.N.A. (Eds.), *Plant, Soil and Microbes: Volume 1: Implications in Crop Science*. Springer International Publishing, Cham, pp. 253–269. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3_13)

Maienfish, P., Huerlimann, H., Rindlisbacher, A., Gsell, L., Dettwiler, H., Haettenschwiler, J., Sieger, E., Walti, M., 2001. The discovery of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid. *Pest Manag. Sci.* 57, 165–176. [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200102\)57:2<165::AID-PS289>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200102)57:2<165::AID-PS289>3.0.CO;2-G)

Mena, P., Tassotti, M., Andreu, L., Nuncio-Jáuregui, N., Legua, P., Del Rio, D., Hernández, F., 2018. Phytochemical characterization of different prickly pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) cultivars and botanical parts: UHPLC-ESI-MS<sup>n</sup> metabolomics profiles and their chemometric analysis. *Food Res. Int.* 108, 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.062>

Mendel, Z., Protasov, A., Vanegas-Rico, J.M., Lomeli-Flores, J.R., Suma, P., Rodríguez-Leyva, E., 2020. Classical and fortuitous biological control of the prickly pear cochineal, *Dactylopius opuntiae*, in Israel. *Biol. Control* 142, 104157. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104157>

Merzendorfer, H., Zimoch, L., 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology* 206, 4393–4412. <https://doi.org/10.1242/jeb.00709>

Michelon, W., Junior, P.R., Knoblauch, P.M., da Rosa, G.A., Mass, A.P., Verona, L., Reimers, M.A., Engel, F., Fongaro, G., Viancelli, A., 2020. Cladodes applied as decentralized ecotechnology to improve water quality and health in remote communities that lack sanitation. *SN Appl. Sci.* 2, 149. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1919-9>

Mishra, P., Mishra, J., Dwivedi, S.K., Arora, N.K., 2020. Microbial Enzymes in Biocontrol of Phytopathogens, in: Arora, N.K., Mishra, J., Mishra, V. (Eds.), *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries, Microorganisms for Sustainability*. Springer, Singapore, pp. 259–285. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5_10)

MJ, O., Lobos, E., Portillo, L., Viguera, A., 2015. Importance of Biotic Factors and Impact on Cactus Pear Production Systems. *Acta Hortic.* 1067, 327–333. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1067.45>

Moss, M. o., 2008. Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1239–1243. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03705.x>

Moussa, Z., Yammouni, D., Dany, A., 2017. *Dactylopius opuntiae* (Cockerell, 1896), a new invasive pest of the cactus plants *Opuntia ficus-indica* in the South of Lebanon (Hemiptera, Coccoidea, Dactylopiidae). *Bull. Société Entomol. Fr.* 2, 173–178.

Mullins, E.D., Kang, S., 2001. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 58, 2043–2052. <https://doi.org/10.1007/PL00000835>

Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., Kenerley, C.M., 2013. *Trichoderma* Research in the Genome Era. *Annual Review of Phytopathology* 51, 105–129. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102353>

## N

Nabti, E.H., Mokrane, N., Ghoul, M., Manyani, H., Dary, M., Megias, M.G., 2013. Isolation and Characterization of Two Halophilic *Bacillus* (*B. licheniformis* and *Bacillus* sp) with Antifungal Activity. *J. Eco. Heal. Env.* 1, 13–17. <https://doi.org/10.12785/jehe/010102>

Nachmias, A., Caligari, P.D.S., Mackay, G.R., Livescu, L., 1988. The effects of *Alternaria solani* and *Verticillium dahliae* on potatoes growing in Israel. *Potato Res* 31, 443–450. <https://doi.org/10.1007/BF02357881>

Nerd, A., Dumoutier, M., Mizrahi, Y., 1997. Properties and postharvest behavior of the vegetable cactus *Nopalea cochenillifera*. *Postharvest Biol. Technol.* 10, 135–143. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(96\)01304-X](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(96)01304-X)

Nharingo, T., Moyo, M., 2016. Application of *Opuntia ficus-indica* in bioremediation of wastewaters. A critical review. *J. Environ. Manage.* 166, 55–72. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.10.005>

Nisa, T., 2013. In vivo assessment of efficacy of different fungicides for control of early blight of tomato. *Life Sciences VOL 10,*

Nobel, P.S., 1995. Environmental biology. FAO Plant Production and Protection Paper (FAO).

Nobel, P.S., Huang, B., 1992. Hydraulic and Structural Changes for Lateral Roots of Two Desert Succulents in Response to Soil Drying and Rewetting. *International Journal of Plant Sciences* 153, S163–S170.

## O

Ongena M, Jacques P, Toure Y, Destain J, Jabrane A, Thonart P (2005). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:29-38.

ONSSA. URL <http://eservice.onssa.gov.ma/IndPesticide.aspx> (accessed 6.11.22).

Örtücü S. 2012. The isolation of entomopathogenic fungito be used in biological control with two spotted spider mite [(*Tetranychus urticae* (Acari, Tetranychidae))] and the determination of their potentials as biopesticides. Ph D thesis, Atatürk University, 144 p

## P

Pacheco-Rueda, I., Lomelí-Flores, J.R., Rodríguez-Leyva, E., Ramírez-Delgado, M., 2011. Life cycle and population parameters of *Symphorobius barberi* Banks (Neuroptera: Hemerobiidae) reared with *Dactylopius opuntiae* Cockerell (Hemiptera: Dactylopiidae). *Acta Zool. Mex.* 27, 325–340.

Palafox-Luna, J., Rodríguez-Leyva, E., Lomeli-Flores, R., Viguera-Guzmán, A., Vanegas-Rico, J., 2018. Life cycle and fecundity of *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) in *Opuntia ficus-indica* (Caryophyllales: Cactaceae). *Agrociencia* 52, 103–114.

Pal, K.K., McSpadden Gardener, B., 2006. Biological Control of Plant Pathogens. PHI. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>

Pal, K.K., McSpadden Gardener, B., 2006. Biological Control of Plant Pathogens. PHI. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>

Passos da Silva, D.M., Houllou-Kido, L.M., Cordeiro dos Santos, D., Gonçalves Ferreira, R., Felipe dos Santos, V., Melo Ferreira, W., Silva de Lima, M., Marinho Falcão, H., de Sena Tabosa, F., 2009. RESISTANCE OF IN VITRO GROWN FORAGE CACTUS CLONES TO

DACTYLOPIUS OPUNTIAE (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE). Acta Hortic. 299–302. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.811.40>

Perry, J.W., Evert, R.F., 1984. Structure of microsclerotia of *Verticillium dahliae* in roots of “Russet Burbank” potatoes. Can. J. Bot. 62, 396–401. <https://doi.org/10.1139/b84-060>

Premono ME, Moawad AM, Vleck LG (1996) Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. Indones. J. Crop Sci 13–23.

## R

Ramírez-Rodríguez, Y., Martínez-Huélamo, M., Pedraza-Chaverri, J., Ramírez, V., Martínez-Tagüena, N., Trujillo, J., 2020. Ethnobotanical, nutritional and medicinal properties of Mexican drylands Cactaceae Fruits: Recent findings and research opportunities. Food Chem. 312, 126073. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126073>

Raza, W., Yuan, J., Ling, N., Huang, Q., Shen, Q., 2015. Production of volatile organic compounds by an antagonistic strain *Paenibacillus polymyxa* WR-2 in the presence of root exudates and organic fertilizer and their antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. Biological Control 80, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.09.004>

Reyes-Agüero, J.A., Rivera, J.R., Hernández, H., 2005. Systematic notes and a detailed description of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). Agrociencia, ISSN 1405-3195, null 39, N°. 4, 2005, pags. 395-408 39.

Reyes-Agüero, J.A., Rivera, J.R., Hernández, H., 2005. Systematic notes and a detailed description of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). Agrociencia, ISSN 1405-3195, null 39, N°. 4, 2005, pags. 395-408 39.

Reyes-Agüero, J.A., Aguirre R., J.R., Valiente-Banuet, A., 2006. Reproductive biology of *Opuntia*: A review. J. Arid Environ. 64, 549–585. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2005.06.018>

Rijkers, A.J.M., Hiemstra, J.A., Bollen, G.J., 1992. Formation of microsclerotia of *Verticillium dahliae* in petioles of infected ash trees. Netherlands Journal of Plant Pathology 98, 261–264. <https://doi.org/10.1007/BF02000094>

Rodrı, J.M.V.E., Mora-aguilera, G., 2016. Biology and life history of *Hyperaspis trifurcata* feeding on *Dactylopius opuntiae*. Biocontrol. <https://doi.org/10.1007/s10526-016-9753-0>

Russell, C.E., Felker, P., 1987. The prickly-pears (*Opuntia* spp., Cactaceae): A source of human and animal food in semiarid regions. Econ. Bot. 41, 433–445. <https://doi.org/10.1007/BF02859062>

RW Dapson, D., 2007. The history, chemistry and modes of action of carmine and related dyes [WWW Document]. URL <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10520290701704188> (accessed 12.22.19).

## S

Sadeghi, A., Koobaz, P., Azimi, H., Karimi, E., Akbari, A.R., 2017. Plant growth promotion and suppression of *Phytophthora drechsleri* damping-off in cucumber by cellulase-producing *Streptomyces*. *BioControl* 62, 805–819. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9838-4>

Sagredo-Beltrán, J., De La Cruz-Rodríguez, Y., Alvarado-Rodríguez, M., Vega-Arreguín, J., Rodríguez-Guerra, R., Alvarado-Gutiérrez, A., Fraire-Velázquez, S., 2018. Genome Sequence of *Bacillus halotolerans* Strain MS50-18A with Antifungal Activity against Phytopathogens, Isolated from Saline Soil in San Luís Potosí, Mexico. *Genome Announc* 6, e00135-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00135-18>

Saleh, I., Al-Thani, R., 2019. Fungal food spoilage of supermarkets' displayed fruits. *Vet World* 12, 1877–1883. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1877-1883>

Salehi, E., Emam-Djomeh, Z., Askari, G., Fathi, M., 2019. *Opuntia ficus indica* fruit gum: Extraction, characterization, antioxidant activity and functional properties. *Carbohydr. Polym.* 206, 565–

Salim, N., Abdelwaheb, C., Rabah, C., Ahcene, B., 2009. Chemical composition of *Opuntia ficus-indica* (L.) fruit. *Afr. J. Biotechnol.* 8. <https://doi.org/10.4314/ajb.v8i8.60345>

Sánchez-Tapia M, Aguilar-López M, Pérez-Cruz C, Pichardo-Ontiveros E, Wang M, Donovan SM, Tovar AR, Torres N. 2017. Nopal (*Opuntia ficus indica*) protects from metabolic endotoxemia by modifying gut microbiota in obese rats fed high fat/sucrose diet. *Sci Rep.* 5;7(1):4716. doi:10.1038/s41598-017-05096-4.

Santos dos Reis, S.D., de Oliveira, R.S., Correia Marcelino, S.A., Ocampos Pedroso, P.M., 2016. Congenital malformations and other reproductive losses in goats due to poisoning by *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz (= *Caesalpinia pyramidalis* Tul.). *Toxicon* 118, 91–94. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.04.043>

Saraf, M., Thakker, A., Patel, B.V., 2008. Biocontrol activity of different species of *Pseudomonas* against phytopathogenic fungi in vivo and in vitro conditions. *International Journal of Biotechnology & Biochemistry* 4, 223–233.

Sawar M, Kremer RJ. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Lett Appl Microbiol* 1995;20:282–5.

Sbaghi, M., Bouharroud, R., Boujghagh, M., Bouhssini, M.E., 2019. Sources de résistance d'*Opuntia* spp. contre la cochenille à carmin, *Dactylopius opuntiae*, au Maroc. *EPPO Bull.* n/a. <https://doi.org/10.1111/epp.12606>

Sbaghi, M, Bouharroud, R., Boujghagh, M., El Bouhssini, M., 2019. Sources de résistance d'*Opuntia* spp. contre la cochenille à carmin, *Dactylopius opuntiae*, au Maroc. *J. Compil.* 0, 1–8. <https://doi.org/10.1111/epp.12606>

Sethi, S., Datta, A., Gupta, B.L., Gupta, S., 2013. Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil. *ISRN Biotechnology* 2013, e985685. <https://doi.org/10.5402/2013/985685>

Shahat, A.A., El-Barouty, G., Hassan, R.A., Hammouda, F.M., Abdel-Rahman, F.H., Saleh, M.A., 2008. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil from the seeds of *Enterolobium contortisiliquum* (leguminosae). *J. Environ. Sci. Health Part B* 43, 519–525. <https://doi.org/10.1080/03601230802174714>

Shahid, M., Zeyad, M.T., Syed, A., Singh, U.B., Mohamed, A., Bahkali, A.H., Elgorban, A.M., Pichtel, J., 2022. Stress-Tolerant Endophytic Isolate *Priestia aryabhatai* BPR-9 Modulates Physio-Biochemical Mechanisms in Wheat (*Triticum aestivum* L.) for Enhanced Salt Tolerance. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19, 10883. <https://doi.org/10.3390/ijerph191710883>

Sharma, A., Shankhdhar, D., Shankhdhar, S.C., 2016. Potassium-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Potassium Solubilization and Uptake, in: Meena, V.S., Maurya, B.R., Verma, J.P., Meena, R.S. (Eds.), *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture*. Springer India, New Delhi, pp. 203–219. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2\\_15](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2_15)

Shuping, D.S.S., Eloff, J.N., 2017. The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: a review. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 14, 120–127. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v14i4>

Siddiqui, I.A., Haas, D., Heeb, S., 2005. Extracellular Protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a Biocontrol Factor with Activity against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 5646–5649. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5646-5649.2005>

Silva, R.C., Ferreira, M.A., Oliveira, J.C.V., Santos, D.C., Gama, M. a. S., Chagas, J.C.C., Inácio, J.G., Silva, E.T.S., Pereira, L.G.R., 2018. Orelha de Elefante Mexicana (*Opuntia stricta* [Haw.] Haw.) spineless cactus as an option in crossbred dairy cattle diet. *South Afr. J. Anim. Sci.* 48, 516–525. <https://doi.org/10.4314/sajas.v48i3.12>

Silveira, R.X., Chagas, A.C.S., Botura, M.B., Batatinha, M.J.M., Katiki, L.M., Carvalho, C.O., Bevilaqua, C.M.L., Branco, A., Machado, E.A.A., Borges, S.L., Almeida, M.A.O., 2012. Action of sisal (*Agave sisalana*, Perrine) extract in the in vitro development of sheep and goat gastrointestinal nematodes. *Exp. Parasitol.* 131, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.03.018>

Siviter, H., Brown, M.J.F., Leadbeater, E., 2018. Sulfoxaflor exposure reduces bumblebee reproductive success. *Nature* 561, 109–112. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0430-6>

Snyman, H.A., 2006. A greenhouse study on root dynamics of cactus pears, *Opuntia ficus-indica* and *O. robusta*. *Journal of Arid Environments* 65, 529–542. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2005.10.004>

Soltani, N., Delbecque, J.-P., Delachambre, J., 1983. Penetration and insecticidal activity of diflubenzuron in *Tenebrio molitor* pupae. *Pestic. Sci.* 14, 615–622. <https://doi.org/10.1002/ps.2780140609>

Stintzing, F.C., Schieber, A., Carle, R., 2001. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *Eur. Food Res. Technol.* 212, 396–407. <https://doi.org/10.1007/s002170000219>

Suarez, B., Rey, M., Castillo, P., Monte, E., Llobell, A., 2004. Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 65, 46–55. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1610-x>

Sundarram, A., Murthy, T.P.K., 2014.  $\alpha$ -Amylase Production and Applications: A Review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology* 2, 166–175. <https://doi.org/10.12691/jaem-2-4-10>

Suganthi, M., Senthilkumar, P., Arvinth, S., Chandrashekara, K.N., 2017. Chitinase from *Pseudomonas fluorescens* and its insecticidal activity against *Helopeltis theivora*. *The Journal of General and Applied Microbiology advpub.* <https://doi.org/10.2323/jgam.2016.11.001>

## T

Thadathil, N., Velappan, S.P., 2014. Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: A review. *Food Chemistry* 150, 392–399. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.083>

Thongpoo, P., 2021. Isolation and Optimization of Lipase Producing Bacteria from Oil-Contaminated Soils. *ASEAN Sci Tech Rept* 24, 38–48. <https://doi.org/10.55164/ajstr.v24i2.242336>

Tielen, P., Rosenau, F., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E., Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. Extracellular enzymes affect biofilm formation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading)* 156, 2239–2252. <https://doi.org/10.1099/mic.0.037036-0>

Torres, J.B., Giorgi, J.A., 2018. Management of the false carmine cochineal *Dactylopius opuntiae* (Cockerell): perspective from Pernambuco state, Brazil. *Phytoparasitica* 46, 331–340. <https://doi.org/10.1007/s12600-018-0664-8>

Torres, M.J., Brandan, C.P., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Audisio, M.C., 2016. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina*

phaseolina: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiological Research* 182, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.09.005>

Tozlu, E., Tekiner, N., Kotan, R., Örtücü, S., 2018. Investigation on the biological control of *Alternaria alternata*. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 7.

Tsalgatidou, P.C., Thomludi, E.-E., Baira, E., Papadimitriou, K., Skagia, A., Venieraki, A., Katinakis, P., 2022. Integrated Genomic and Metabolomic Analysis Illuminates Key Secreted Metabolites Produced by the Novel Endophyte *Bacillus halotolerans* Cal.1.30 Involved in Diverse Biological Control Activities. *Microorganisms* 10, 399. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020399>

Tsavkelova, E.A., Cherdyntseva, T.A., Netrusov, A.I., 2005. Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Microbiology* 74, 46–53. <https://doi.org/10.1007/s11021-005-0027-6>

## V

VANEGAS-RICO, J., Lomeli-Flores, R., Rodríguez-Leyva, E., Mora-Aguilera, G., Valdez, J., 2010. Natural enemies of *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) on *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller in Central Mexico 26, 415–433.

Vanegas-Rico, J.M., Rodríguez-Leyva, E., Lomeli-Flores, J.R., González-Hernández, H., Pérez-Panduro, A., Mora-Aguilera, G., 2016. Biology and life history of *Hyperaspis trifurcata* feeding on *Dactylopius opuntiae*. *BioControl* 61, 691–701. <https://doi.org/10.1007/s10526-016-9753-0>

Vaghela, B., Vashi, R., Rajput, K., Joshi, R., 2022. Plant chitinases and their role in plant defense: A comprehensive review. *Enzyme Microb Technol* 159, 110055. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110055>

Velez, B., Diniz, A., Barbosa, L., Santos, A.C., Félix, A., Tiago, P., 2019. Potential of *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex isolates with *Chenopodium ambrosioides* and *Enterolobium contortisiliquum* extracts to control *Dactylopius opuntiae*. *Int. J. Trop. Insect Sci.* <https://doi.org/10.1007/s42690-019-00014-9>

Venkatakrishnan SS, Sudalayandy RS, Savariappan AR. Assessing in vitro solubilization potential of different zinc solubilizing bacterial (ZSB) strains. *Braz J Microbiol* 2003;34:121–5.

Vera-Ponce de León, A., Sanchez-Flores, A., Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E., 2016. Fungal Community Associated with *Dactylopius* (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae) and Its Role in Uric Acid Metabolism. *Front. Microbiol.* 7, 954. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00954>



Vigueras, A., Cibrián-Tovar, J., Pelayo Ortiz, C., 2009. Use of botanicals extracts to control wild cochineal (*Dactylopius opuntiae* Cockerell) on cactus pear. *Acta Hort.* 811, 229–234. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.811.28>

Vigueras, A., Portillo, L., 2016. Good agricultural practices for fine cochineal production. pp. 25–30.

Viljoen, J.J.F., Labuschagne, N., Fourie, H., Sikora, R.A., 2019. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomatoes and carrots by plant growth-promoting rhizobacteria. *Trop. plant pathol.* 44, 284–291. <https://doi.org/10.1007/s40858-019-00283-2>

## W

Wu, X., Wu, H., Wang, R., Wang, Z., Zhang, Y., Gu, Q., Farzand, A., Yang, X., Semenov, M., Borriss, R., Xie, Y., Gao, X., 2021. Genomic Features and Molecular Function of a Novel Stress-Tolerant *Bacillus halotolerans* Strain Isolated from an Extreme Environment. *Biology* 10, 1030. <https://doi.org/10.3390/biology10101030>

## Y

Yadav, K. S., Dadarwal, K. R. (1997): Biotechnological approaches in soil microorganisms for sustainable crop production. Scientific publishers, Jodhpur, India. pp. 293–308.

Yahia, E.M., Mondragon-Jacobo, C., 2011. Nutritional components and anti-oxidant capacity of ten cultivars and lines of cactus pear fruit (*Opuntia* spp.). *Food Res. Int., Exotic Fruits: their Composition, Nutraceutical and Agroindustrial Potential* 44, 2311–2318. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.042>

Yao, X., Min, H., Lü, Z., Yuan, H., 2006. Influence of acetamiprid on soil enzymatic activities and respiration. *Eur. J. Soil Biol.* 42, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2005.12.001>

## Z

Zahir, I., Houari, A., Iraqui, M., & Ibsouda, S. (2018). Valorisation de l'activité antibactérienne des microorganismes isolés à partir des biotopes marocains et caractérisation partielle de leurs principes actifs. *Proceedings BIOSUNE*, 1-2018.

Zahir, I., 2014. Partial Purification and Antimycobacterial Screening of the Ethyl Acetate Extract of *Alcaligenes faecalis* BW1. *BMRJ* 4, 1178–1188. <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2014/10595>

- Zaidi, A., Khan, M., Ahmad, M., Oves, M., 2009. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 56 (3), 263–284.
- Zhang, D., Yu, S., Yang, Y., Zhang, J., Zhao, D., Pan, Y., Fan, S., Yang, Z., Zhu, J., 2020. Antifungal Effects of Volatiles Produced by *Bacillus subtilis* Against *Alternaria solani* in Potato. *Front Microbiol* 11, 1196. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01196>
- Zhao, J., Liu, D., Wang, Y., Zhu, X., Chen, L., Duan, Y., 2020. Evaluation of *Bacillus aryabhattai* Sneb517 for control of *Heterodera glycines* in soybean. *Biological Control* 142, 104147. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104147>
- Zhu, X., Zhou, Y., Feng, J., 2007. Analysis of both chitinase and chitosanase produced by *Sphingomonas* sp. CJ-5. *J. Zhejiang Univ. - Sci. B* 8, 831. <https://doi.org/10.1631/jzus.2007.B0831>
- Zeitoun, R., Hayar, S., Majed, L., El-Omari, K., Dousset, S., 2020. Comparison of the efficacy of two insecticides for the management of *Dactylopius opuntiae* on prickly pear cactus in Lebanon and monitoring of the insecticides residues dissipation rates in fruits and cladodes. *SN Appl. Sci.* 2. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1910-5>
- Zhu, Y., Loso, M.R., Watson, Gerald.B., Sparks, T.C., Rogers, R.B., Huang, J.X., Gerwick, B.C., Babcock, J.M., Kelley, D., Hegde, V.B., Nugent, B.M., Renga, J.M., Denholm, I., Gorman, K., DeBoer, G.J., Hasler, J., Meade, T., Thomas, J.D., 2011. Discovery and Characterization of Sulfoxaflor, a Novel Insecticide Targeting Sap-Feeding Pests. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2950–2957. <https://doi.org/10.1021/jf102765x>
- Zimmermann, H.G., Moran, V.C., 1991. Biological control of prickly pear , *Opuntia ficus-indica* ( Cactaceae ), in South Africa. *Agriculture Ecosyst. Environment* 37, 29–35.
- Zito, P., Sajeva, M., Bruno, M., Rosselli, S., Maggio, A., Senatore, F., 2013. Essential oils composition of two Sicilian cultivars of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae) fruits (prickly pear). *Nat. Prod. Res.* 27, 1305–1314. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.734823>

# Annexe 1 : les milieux de culture

**Le milieu (YEM) :** Extrait de levure - 0,5 g, Mannitol - 5,0 g,  $K_2HPO_4$  - 0,5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,2 g, NaCl - 0,1 g, Agar - 20,0 g, et 1000 ml d'eau distillée.

**Le milieu gélosé de Pikovskaya (PVK) :** glucose - 10 g, phosphate de calcium - 5 g, sulfate d'ammonium - 0,5 g, chlorure de potassium - 0,2 g, sulfate de magnésium - 0,1 g, extrait de levure - 0,5 g, gélose - 15 g, eau distillée - 1000 ml.

**Le milieu de gélose aux sels minéraux :** Glucose - 10 g,  $(NH_4)_2SO_4$  - 1,0 g, KCl - 0,2 g,  $K_2HPO_4$  - 0,1 g,  $MgSO_4$  - 0,2 g et eau distillée - 1000 ml (avec pH 7,0)

**Le milieu solide de Burk :** glucose - 10 g,  $KH_2PO_4$  - 0,41 g,  $K_2HPO_4$  - 0,52 g,  $Na_2SO_4$  - 0,05 g,  $CaCl_2$  - 0,2 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,1 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,005 g,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  - 0,0025 g, gélose - 20 g, et eau distillée - 1000 ml.

**Le bouillon d'extrait de levure tryptone/peptone :** peptone/tryptone - 10 g, extrait de viande - 3 g, NaCl - 5 g, l-tryptophane - 0,204 g, eau distillée - 1000 ml (avec pH 7,0).

**Le milieu d'Aleksandrov :** glucose - 0,5 % ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,05 % ,  $FeCl_3$  - 0,0005 % ,  $CaCO_3$  - 0,01 % ,  $Ca_3(PO_4)_2$  - 0,2 % et  $K_2O_3Si$  - 0,2 % .

**Le milieu chrome Azurol S (CAS) :** 900 ml du milieu LB (les composants de 1L), 50 ml de la solution CAS (60,5 g sur 50 ml), 10 ml de la solution  $FeCl_3$  (27 mg + 0.083 ml HCl + 100 ml d'eau distillée), et 40 ml de la solution HDMTA (Hexa Decyl Trimethyl Ammonium bromide) (72.9 mg + 40 ml d'eau distillée).

**La gélose à l'amidon :** peptone - 5 g, extrait de viande - 3 g, amidon soluble - 10 g, gélose - 15 g, eau distillée - 1000 ml.

**La gélose au lait écrémé :** lait écrémé - 100 g, peptone - 5 g, agar - 15 g, eau - 1000 ml.

**Le milieu de base :**  $NaNO_3$  - 1 g,  $K_2HPO_4$  - 1 g, KCl - 1 g,  $MgSO_4$  - 0,5 g, extrait de levure - 0,5 g, glucose - 1 g, distillé eau - 1000 ml, gélose - 15 g.

**Réactif de Salkawski :** 2 g -  $FeCl_3$ , 42.19 ml - acide sulfurique concentré, eau distillée - 50 ml.