

N°d'ordre /.....

THESE

Présentée

Pour l'obtention du Doctorat National

UFR : Biologie appliquée
Spécialité : Phytopathologie

Utilisation des *Pseudomonas* spp. fluorescents et des plantes aromatiques et médicinales contre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agent du chancre bactérien de la tomate

Par

NADIYA AMKRAZ ép. MASTOUR

Soutenue le : **29 juin 2013 à 9h** devant la commission d'examen :

Mme. L. M. IDRISSE HASSANI.....	Professeur, F. des Sciences, Agadir.....	Présidente / Examinatrice
Mr. Y. OUHDOUCH.....	Professeur, F. des Sciences, Semlalia Marrakech.....	Rapporteur
Mr. A. REMAH.....	Professeur, Complexe horticole, IAV, Agadir.....	Rapporteur
Mme. S. TAHROUCH.....	Professeur, F. des Sciences, Agadir.....	Rapporteur
Mr. A. AIT BEN AOUMAR.....	Professeur, F. des Sciences, Agadir.....	Directeur de thèse
Mr. E. H. BOUDYACH.....	Professeur, F. des Sciences, Agadir.....	Co-directeur de thèse
Mr. M. ABIDI	Ingénieur d'état agronome.....	Invité

*Je dédie cette thèse, le fruit de plusieurs années
d'étude et de sacrifices,*

A la mémoire de mon père

A ma chère mère

A tous ceux que j'aime et spécialement

*A mon mari Rachid et mes adorables
enfants Saad et Rime. Que Dieu vous
garde et vous protège. Amène.*

Remerciements

Cette thèse s'achève et ce document commence par les indispensables remerciements pour tous ceux qui m'ont accompagné et m'ont apporté leur aide et leur soutien. Au premier lieu je tiens à remercier mes deux directeurs de thèse qui m'ont accompagné au fil des jours Mrs. les Professeurs Abdellah Ait Ben Aoumar et El Hassan Boudyach. Merci au Professeur Abdellah Ait Ben Aoumar, avec qui j'ai travaillé depuis mon DESA, pour son encadrement scientifique, sa bienveillance, son encouragement et plus particulièrement pour l'estime qu'il m'a toujours accordé. Ma reconnaissance envers lui est immense. Vous étiez pour moi le père que j'ai perdu à l'âge de trois ans! Je tiens à remercier Mr. Le Pr. El Hassan Boudyach, de m'avoir toujours accueilli dans son équipe et de m'avoir légué toutes ses connaissances en termes de lutte biologique et lutte intégrée contre le chancre bactérien de la tomate.

Un grand merci est réservé à Mr. Abdellah Remah d'une part d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail et d'autres parts de m'avoir facilité l'accès à la serre du complexe horticole de l'IAV d'Agadir pour compléter l'un des aspects de cette thèse. Mes remerciements ne sont que très forts pour Mme Saida Tahrouch d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et du soutien moral et cognitif qu'elle m'a accordés au cours des dernières étapes de mon travail concernant la caractérisation phytochimique des plantes aromatiques et médicinales. Que Mr Yedir Ouhdouch trouve ici l'expression de mon grand estime et de mes sincères remerciements d'avoir accepté d'expertiser ce travail. Merci au Professeur Lala Amina Idrissi d'avoir accepté de présider le jury de cette soutenance. Je tiens aussi à remercier infiniment Mr. Mohamed Abidi, de m'avoir ouvert les portes de sa ferme El Baraka pour y réaliser l'essai in vivo des agents de bio contrôle du genre *Pseudomonas* et d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Ce travail ne serait pas complété sans l'aide précieuse de Mrs. les Prs. Fouad Msanda et Baha Saadi, une aide relative à leur contribution dans la collecte et l'identification des plantes aromatiques et médicinales que nous avons testées. Qu'ils acceptent mes remerciements en témoignage de ma reconnaissance. Ma profonde reconnaissance va aussi à Mr. le Professeur Hassan Boubaker pour son encadrement attentif, constructif, pour sa disponibilité, sa gentillesse et sa patience face à mes nombreuses sollicitations. Que DIEU le préserve pour tous ceux qui l'aiment et qui ont une grande estime pour lui. Je remercie également Mr. Le Professeur Brahim Bouizgaren pour toute l'aide qu'il m'a apportée au cours de la rédaction des articles et de la partie « identification moléculaire des *Pseudomonas* ». Vos conseils judicieux ont illuminé ma façon de voir les choses. Mes chaleureux remerciements vont aussi

à tous les membres de notre laboratoire ; enseignants et étudiants. Je n'oublierai pas de remercier Mr. le Pr. Abdelhamid El Moussadik, responsable du LBVRN, pour l'accueil chaleureux qu'il m'a accordé du laboratoire dont il est responsable tout le long de ces années.

Mes chaleureux remerciements sont destinés à tous les membres du laboratoire Régional d'analyses et de recherches de l'office national de sécurité sanitaire des produits alimentaires (ONSSA), au nom de son responsable Mr. Nouredine Chawki , pour toute l'aide qu'ils m'ont accordée lors de la réalisation de l'identification préliminaire des isolats bactériens.

Je tiens aussi à remercier sincèrement tous les membres de la plateforme génomique fonctionnelle du CNRST de Rabat pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont accordé au cours de mon séjour parmi eux. Merci beaucoup Mr. El Fahime, Sana, Marouan et Aziz. Grand merci pour Mr. El Hadek pour l'autorisation d'accéder à son laboratoire et de réaliser l'extraction des huiles essentielles. Je vous serai reconnaissante toute ma vie. Les années de thèse, c'est aussi des années de vie partagées avec mes amis qui ont toujours été là aux moments forts de cette thèse et l'ont aussi merveilleusement égaillée: les amis d'ici et d'ailleurs, de thèse et de toujours. Merci Naima, Ismail, Redouan, Oukacha, Driss, Mina, Latifa, Fatima, Aissam, Rachida, Najat, Kamar, Zakia, Said, Ali....la liste est très longue !!! Que ceux que j'ai oubliés de citer trouvent ici l'expression de tout mon respect et pardonnent mon oubli ! Vous savez bien que ma mémoire me joue souvent des tours ces derniers jours !!!

Mes remerciements sont également adressés à Mme. Ilhame Chaouni, Mme. Zhour Ibannain, Mme. Zahra Brakez, Mme. Rabiaa Seghir, Mme. Fatiha Fadel, Mme. Bouchra Chebli pour leur amitié et leurs encouragements tout le long de mon séjour à la Faculté des Science d'Agadir. Un séjour qui a duré assez longtemps pour que je puisse tisser des relations amicales avec presque la totalité des gens qui y travaillent (enseignants, administratifs, étudiants, femmes de ménage, sécurité...). Qu'ils trouvent ici tous l'expression de mon amitié et de mon respect à l'unanimité !

En dernier lieu mon remerciement n'en est que plus fort à ma famille qui m'a toujours soutenue et encouragée, merci à mon très cher mari Rachid, et à mes petits bouts de choux Saad et Rime pour leur appui, leur compréhension mais surtout pour leur amour indéfectible. Pardonnez s'il vous plait mon égoïsme et mon absence pendant des moments critiques de votre vie ! Et sachez bien que sans vous, je ne serais pas où j'en suis aujourd'hui. Merci aussi à ma chère mère et mes deux sœurs Laila et Malika pour leur gentillesse et leur soutien.

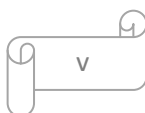
Merci à tous pour tout...et BONNE LECTURE !

Notre thème de recherche s'insère dans le cadre de la lutte biologique qui peut être considérée comme une alternative potentielle à la lutte chimique. Les études que nous avons menées visaient dans un premier temps la recherche et la sélection des *Pseudomonas* spp. fluorescents antagonistes à l'agent du chancre et dans un deuxième temps l'évaluation des substances naturelles extraites des plantes en vue de leur utilisation contre cette bactériose. Nous disposons d'une collection de *Pseudomonas* spp. fluorescents antagonistes à *C.m.m.* et colonisatrices des racines de la tomate. Les isolats antagonistes sélectionnés ont été criblés à l'aide du test de dessèchement des cotylédons. Les huit isolats retenus ont significativement réduit l'incidence du dessèchement des cotylédons. L'efficacité des souches retenues est ensuite évaluée en pots sous serre ; l'incidence du chancre bactérien est ralentie après la bactérisation des semences et des racines des plants de tomate. La capacité des deux meilleurs isolats (RN39e et RN69) de protéger la tomate contre l'invasion du chancre bactérien a été confirmée condition de production de la tomate sous serre et un effet PGPR relatif a été relevé ; surtout dans les premiers stades de la culture. De plus, ces deux isolats résistent bien à certains facteurs abiotiques à savoir la température, le pH et les sels. L'identification génétique des meilleurs isolats de *Pseudomonas* par séquençage de l'ARN 16S et celui du gène *rpoB* nous a permis de confirmer l'hétérogénéité de notre collection. Deux principaux groupes ont été définis : le groupe apparenté à *P. azotoformans* et le groupe apparenté à *P. plecoglossicida*. Un autre axe est développé, en termes de lutte biologique contre le chancre bactérien, à savoir l'utilisation des extraits de plantes médicinales. Les essais réalisés *in vitro* avec les extraits aqueux de 40 plantes, du sud marocain, ont permis de sélectionner quelques plantes à pouvoir inhibiteur élevé et appartenant aux genres *Lavandula*, *Rubus*, *Rosa*, *Cistus*, *Pistacia* et *Anvillea*. Par ailleurs, le traitement des semences de tomate récupérées à partir des fruits naturellement infectées par *C.m.m.*, par les extraits des meilleures extraits a permis l'amélioration de leur pouvoir germinatif. Le traitement des semences, artificiellement enrobées par les cellules du pathogène, avec les meilleurs extraits réduit significativement la population du pathogène à la surface de ces semences par rapport au témoin. L'analyse par CCM des extraits évalués montre qu'ils sont riches en composés phénoliques ; acides phénols et flavonoïdes. Le dosage des phénols, des flavonoïdes ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante a mis en évidence une corrélation linéaire significative entre l'activité biologique et l'activité antioxydante des extraits aqueux et la richesse en composés phénoliques et en flavonoïdes. Une autre corrélation positive est établie entre l'activité antioxydant et l'activité biologique.

Mots clés : Chancre bactérien - Tomate - Antagonisme - Lutte biologique - *Pseudomonas* spp. fluorescents - Plantes médicinales.

Our research topic fits into the context of biological control which can be considered as a potential alternative to chemical control when used to control most of the diseases of vegetable crops including tomatoes. The studies conducted aimed at first the search and selection of fluorescent *Pseudomonas* antagonists to canker's agent and secondly the assessment of natural substances extracted from plants for use in biological control against this disease. We have a collection of fluorescent *Pseudomonas* antagonists towards this pathogen and colonizing the roots of tomato plants. Antagonists selected isolates were screened using the cotyledons test. Eight isolates were selected after this test; they have significantly reduced the incidence of drying cotyledons compared to the positive control. The effectiveness of selected strains by previous tests is evaluated in pots in the greenhouse; the incidence of bacterial canker was reduced after bacterization of seeds and roots of tomato plants. The ability of the two best isolates (RN69 and RN39e) to protect against the invasion of tomato bacterial canker in the field was carried out. The results are very promising and they have confirmed that these two isolates of fluorescent *Pseudomonas* significantly reduce the incidence of disease compared to untreated controls. We could also see a very interesting PGPR effect especially in the early stages of culture. The in vitro action of some abiotic i.e.; temperature, pH and salts on the growth of the two best isolates RN39e and RN69 was evaluated. The results show that these two isolates have a wide range of resistance to tested factors. The genetic identification of isolates of *Pseudomonas* was achieved by sequencing the 16SrRNA and the rpoB genes. The results confirmed the heterogeneity of our collection because we have identified two main groups' namely *P. azotoformans* and *P. plecoglossicida*. Another line is developed in terms of biological control against bacterial canker namely the use of extracts from southern Moroccan medicinal plants. The results obtained in this context are very interested. Indeed, in vitro tests with aqueous extracts of 40 plants of southern Morocco have shown inhibition zones of growth of the pathogen that are between 5 and 50 mm. The best results were obtained with the plants belonging to the genus *Lavandula*, *Rubus*, *Rosa*, *Cistus*, *Pistacia* and *Anvillea*. Treatment of tomato Seeds, infected with Cmm, with extracts of these plants do not have a negative impact on their ability to germinate and we even noticed a significant reduction in the population of the pathogen on the surface of treated seed. Preliminary phytochemical screening is performed for the 40 plants tested with TLC. The evaluation of flavonoid content, phenols content and the antioxidant activity was performed. The results showed that the best plants are rich in phenols compounds and flavonoids. A significant linear correlation was found between the biological activity, the antioxidant ability and richness with phenolic compounds. Another positive correlation was also found between the biological activity and the antioxidant ability.

Keywords: Bacterial canker - Tomato - Biological control - fluorescent *Pseudomonas* - Medicinal Plants.



تنصب دراستنا في إطار مكافحة البيولوجية و ذلك بإنتقاء و عزل بكتيريات تنتمي لجنس *Pseudomonas* منافسة للعامل المسبب لمرض قرحة الطماطم البكتيري بالإضافة الى مستخلصات النباتات الطبية و العطرية التي تنمو في الجنوب المغربي و التي تمنع العامل المسبب للمرض من النمو و ذلك من أجل استعمالها كمبيدات بيولوجية. لقد تم عزل و إنتقاء أكثر من 300 بكتيرية من محيط جذور نباتات طماطم سليمة توجد داخل بؤرة للمرض البكتيري المدروس. أثبتت التجارب المخبرية التي تمت فيها مجابهة العامل الممرض مع البكتيريات المعزولة على الوسط الغذائي أنها تكبح نموه. لقد تمت ايضا دراسة قدرة أفضل البكتيريات الكابحة على استيطان جذور نباتات الطماطم و بعد ذلك تمت غرلة و عزل البكتيريا المنتقاة (42 بكتيرية) بواسطة اختبار تيبس الفلقات في نهاية هذا الاختبار تم عزل أفضل 8 بكتيريا. استعملت البكتيريا المنتقاة في اختبار الفعالية داخل أصص بلاستيكية تحت ظروف متحكم فيها. النتائج المحصل عليها أثبتت أن البكتيريتين RN69 و RN39e تؤخران ظهور المرض بشكل ملحوظ مقارنة مع التجربة الشاهدة. هاتان البكتيريتان استعملتا في اختبار آخر للفعالية في ظروف شبه تسويقية داخل بيت بلاستيكي. نتائج الاختبار كانت جد ايجابية حيث أظهرت النباتات المعالجة مقاومة جيدة للمرض المدروس مقارنة مع النباتات الشاهدة غير المعالجة. و تجدر الإشارة إلى أن البكتيريتين حسنتا أيضا مردودية نباتات الطماطم المعالجة. تتمتع هاتان البكتيريتان أيضا بمجال تحمل كبير لبعض الخصائص الإحيائية للوسط كالحمضية وتركيز بعض الأملاح و الحرارة. قمنا أيضا بمحاولة لتحديد نوع البكتيريات المنتقاة خلال هذه الدراسة اعتمادا على تقنية التصنيف الجيني وذلك بتحديد متتالية النكليوتيدات المكونة لمورثة الحمض النووي الريبوزومي 16S ARNr و كذا مورثة *rpoB*. النتائج المحصلة أكدت عدم تجانس المجموعة البكتيرية التي تتوفر عليها، حيث استطعنا الفصل بين مجموعة *P. plecoglossicida* و مجموعة *P. azotoformans*. أعطت التجارب المخبرية التي اعتمدت على المستخلصات المائية لأربعين نبتة عطرية و طبية، تم قطفها من مناطق مختلفة من الجنوب المغربي، نتائج مشجعة حيث تراوحت مناطق كبح العامل الممرض في الزجاج ما بين 5 و 50 ملم. وقد تم الحصول على أحسن النتائج بواسطة النباتات التي تنتمي إلى الأجناس التالية: *Anvillea*, *Pistacia*, *Cistus*, *Rosa*, *Lavandula*. كما أن معالجة البذور المأخوذة من حبات طماطم مصابة، بمستخلصات أفضل النباتات، أدت إلى تحسين القدرة الإنباتية للبذور المعالجة. معالجة بذور الطماطم، التي غلفت بشكل اصطناعي بالبكتيرية المسببة للمرض، بواسطة مستخلصات أفضل النباتات أدت إلى تقليص كثافة العامل الممرض على سطح هذه البذور مقارنة مع البذور الشاهدة غير المعالجة. التحليل الكروماتوغرافي على الشرائح الدقيقة من السيليلوز CCM للمستخلصات العضوية اثبت غنى هذه المستخلصات بالمركبات الفينولية التي تنتمي خاصة إلى مجموعة الأحماض الفينولية و مجموعة الفلافونويدات لتعزيز و تأكيد هذه النتائج ارتأينا القيام بمعايرة كمية المركبات الفينولية و الفلافونويدات. و كذا قياس القدرة المضادة للتأكسد للمستخلصات العضوية لستة عشر نبتة طبية. النتائج المحصلة أثبتت وجود توافق إيجابي كبير بين تركيز المركبات المعاييرة من جهة و قطر مناطق الكبح في الزجاج و كذا القدرة المضادة للتأكسد من جهة ثانية. أثبتنا وجود توافق إيجابي كبير أيضا بين قطر مناطق الكبح في الزجاج و القدرة المضادة للتأكسد.

الكلمات المفاتيح: مكافحة البيولوجية – البكتيريات من جنس *Pseudomonas* – مرض قرحة الطماطم البكتيري – النباتات الطبية و العطرية – الطماطم.

PUBLICATIONS

- Talibi I., **Amkraz N.**, Msanda F., Boudyach E. H., Boubaker H., Bouizgarne B., Ait Ben Aoumar A. (2011). Antibacterial activity of Moroccan plants extracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomatoes' bacterial canker. J. of Medicinal P. Res. 5 (17): 4332-4338.
- **Amkraz N.**; Boudyach E. H.; Boubaker H.; Bouizgarne B.; Ait Ben Aoumar A. (2010). Screening for fluorescent pseudomonads, isolated from the rhizosphere of tomato plants, for antagonistic activity towards *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. World J. Microbiol. Biotechnol. 26 (6): 1059-1065.
- **Amkraz N.**; Boudyach E. H.; Boubaker H.; Ait Ben Aoumar A. (2006). Isolement, triage et sélection des *Pseudomonas* fluorescents et évaluation de leur effet protecteur vis-à-vis du chancre bactérien de la tomate. In Actes du 2^{ème} Congrès International de Biochimie. Agadir, 09-12 Mai 2006 : 347-351.
- **Amkraz N.**, Boubaker H., Bouizgarne B., Boudyach E.H. and Ait Benaoumar A. (2013). Effectiveness of RN 69 and RN 39e, two fluorescents Pseudomonads associated with antibacterial activity on the biological control of bacterial canker agent on tomato. (À soumettre pour publication).
- **Amkraz N.**, Talibi I., Boubaker H., Bouizgarne B., Msanda F., Boudyach E.H. and Ait Benaoumar A. (2013). Antioxidant activity, phenols and falvonoids contents of some Moroccan medicinal plants associated with antibacterial activity in tomato. (À soumettre pour publication).

COMMUNICATIONS ORALES

- **Amkraz N.**; Talibi I.; Boudyach E. H.; Boubaker H.; Bouizgarne B.; Ait Ben Aoumar A. (2009). Les extraits des plantes du Sud Marocain en lute biologique contre le chancre bactérien de la tomate. Oral communication in the Symposium of the phenolics compounds untitled: Nuraceutiques ou médicaments? Agadir, Morocco 17-18 December 2009.
- **Amkraz N.**; Bouizgarne B.; Boudyach E. H.; Boubaker H.; Ait Ben Aoumar A. (2009). Screening for fluorescent *Pseudomonads*, isolated from the rhizosphere of tomato plants, for antagonistic activity towards *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Oral communication in the First MICROBIOD International Congress

untitled: "Microbial Biotechnology for Development", Marrakech (Morocco), 02-05 November 2009.

- **Amkraz N.**; Bouizgarne B.; Boudyach E. H.; Boubaker H.; Ait Ben Aoumar A. (2009). Screening of fluorescent *Pseudomonads*, isolated from the rhizosphere of tomato plants, for their antagonistic activity towards bacterial canker agent: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Oral communication in the Third SMBBM International Congress of Biochemistry in parallel with the IUBMB Special Meeting on Plant stresses and The Sixth FASBMB Congress, Marrakech (Morocco), April 20-25, 2009.
- **Amkraz N.**; Boudyach E. H.; Boubaker H.; Ait Ben Aoumar A. (2008). Sélection des *Pseudomonas* fluorescents antagonistes de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agent causal du chancre bactérien de la tomate. Communication orale aux 5èmes JOURNEES NATIONALES DE BIODIVERSITE Faculté des Sciences et Techniques, Fès 18-20 décembre 2008.
- **Amkraz N.**; Boudyach E. H.; Boubaker H.; Ait Ben Aoumar A. (2006). Isolement, triage et sélection des *Pseudomonas* fluorescents et évaluation de leur effet protecteur vis-à-vis du chancre bactérien de la tomate. Communication orale au 2^{ème} Congrès International de Biochimie. Agadir, 09-12 Mai 2006.

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

- Talibi I.; **Amkraz N.**; Boudyach E. H.; Boubaker H.; Ait Ben Aoumar A. (2009) Activité de certaines plantes du sud marocain sur *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agent du chancre bactérien de la tomate. Affiche au congrès des plantes médicinales de Marrakech
- **Amkraz N.**; Boudyach E. H.; Boubaker H.; Ait Ben Aoumar A. (2007). Sélection des *Pseudomonas* fluorescents antagonistes de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* agent causal du chancre bactérien de la tomate. Communication affichée à la Conférence Internationale sur les Biotechnologies Microbiennes et leur Applications du 24 au 25 Octobre 2007 à Meknès.
- **Amkraz N.**; Boudyach E. H.; Boubaker H.; Ait Ben Aoumar A. (2006). Lutte microbiologique contre le chancre bactérien de la tomate par des *Pseudomonas*

fluorescents. communication affichée à la rencontre de Biotechnologie microbienne qui a eu lieu le 27 novembre 2006 à la FST de Fès.

- **Amkraz N.;** Boudyach E. H.; Boubaker H.; Ait Ben Aoumar A. (2006). Lutte biologique contre le chancre bactérien de la tomate par des *Pseudomonas* fluorescents. Communication affichée (Poster) La quatrième édition de la Semaine Nationale de la Science. Faculté des Sciences Agadir, Maroc, Avril 2006.
- **Amkraz N.;** Boudyach E. H.; Boubaker H.; Ait Ben Aoumar A. (2006). Sélection des *Pseudomonas* fluorescents antagonistes de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* agent causal du chancre bactérien de la tomate. Communication affichée aux Journées Portes ouvertes « Sensibilisation et valorisation du patrimoine Scientifique » organisées par l'Association des Etudiants Chercheurs de la Faculté des Science d'Agadir AECFSA le 17 et 18 Février 2006 à la Faculté des Sciences d'Agadir.
- **Amkraz N.;** Boudyach E. H.; Boubaker H.; Ait Ben Aoumar A. (2005). Lutte biologique contre le chancre bactérien de la tomate par des *Pseudomonas* fluorescents. Communication affichée (Poster) au Workshop de Settat, Maroc, 06 Mai 2005.

Sommaire

Dédicace.....	i
Remerciements.....	ii
Résumé.....	iv
Abstract.....	v
ملخص	vi
Liste des publications.....	vii
Sommaire	x
Liste des abréviations.....	xvi
Liste des figures	xvii
Liste des tableaux.....	xxi

Introduction Générale.....	1
-----------------------------------	----------

CHAPITRE I : Etude Bibliographique

I-Aperçu général sur la culture de la tomate	4
1- Taxonomie.....	4
2- Description botanique de la plante.....	4
3- Origine de la tomate.....	5
4- Les types variétaux de la tomate cultivée	6
5- Valeur nutritive de la tomate	9
6- Importance économique de la tomate	11
6.1- A l'échelle mondiale	11
6.2- A l'échelle nationale	12
6.3- A l'échelle régionale	14
7- Les maladies de la tomate.....	16
II. Le chancre bactérien de la tomate	16
1-L'agent causal	17
1.1- Classification.....	17
1.2- Morphologie et mode de vie	18
2-La plante hôte	19



3-Symptômes du chancre bactérien de la tomate	20
3.1- Symptômes du chancre bactérien sur les feuilles	20
3.2- Symptômes du chancre bactérien sur la tige	23
3.3- Symptômes du chancre bactérien sur le fruit	23
3.4- Symptômes du chancre bactérien sur les racines	24
4- Cycle épidémiologique	24
5- Facteurs influençant l'agressivité de la bactérie	26
6-Méthodes de détection de l'agent pathogène au niveau des semences	26
6.1- Les méthodes standards	26
6.2- Les méthodes sérologiques	27
6.3- Combinaison des méthodes sérologiques et standards	27
6.4- Les méthodes moléculaires	28
7-Méthodes d'identification avec les tests de pathogénie et de virulence	29
8-Méthodes de lutte contre <i>C. m. subsp. michiganensis</i>	30
III- Les microorganismes et la lutte biologique	30
1- Les <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents et la lutte biologique	31
2- La colonisation une étape clé dans la sélection des antagonistes	35
2.1-Bactérisation des semences	36
2.1.1-Techniques de bactérisation des semences	36
2.1.2-Avantages et limites de la bactérisation	37
2.2-Méthodes de détection des antagonistes introduits dans la rhizosphère	38
2.2.1-Techniques immunologiques	38
2.2.2-Techniques utilisant des gènes marqueurs	38
a-Mutants spontanés résistants aux antibiotiques	38
b-Souches génétiquement modifiées	39
3- Les mécanismes d'action des PGPR agents de contrôle biologique	39
3.1-Action directe	39
3.1.1-L'antibiose	40
3.1.2-La compétition	42
3.2-Action indirecte	43
IV- L'identification des <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents	44
1- Identification phénotypique	44
2- Identification moléculaire	45

V- Les plantes aromatiques et médicinales et la lutte biologique.....	50
1- Les plantes aromatiques et médicinales au Maroc.....	50
2- Exemples d'essais de lutte contre les phytopathogènes avec des PAM	51

Chapitre II : Collection et étude des isolats du pathogene ; *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

I- Introduction	54
II- Matériel et méthodes	54
1- Prospection et prélèvement des échantillons	54
2- Isolement et identification	54
3- Purification et conservation des isolats.....	55
4-Etude du pouvoir pathogène des isolats.....	55
4.1-Test d'hypersensibilité sur des feuilles de tabac	56
4.2- Test de flétrissement et de dessèchement des cotylédons.....	56
4.3- Induction des taches en œil d'oiseaux sur fruits	58
4.4- Test de flétrissement des plantules.....	58
5- Analyse statistique	59
III- Résultats	59
1- Isolement et identification de <i>C. m.</i> subsp. <i>michiganensis</i>	59
2- Etude du pouvoir pathogène	61
2.1- Tests d'hypersensibilité.....	61
2.2- Test de flétrissement et dessèchement des cotylédons.....	61
2.3- Test d'induction des taches en œil d'oiseaux.....	62
2.4- Test de flétrissement des plantules.....	63
IV- Discussion et conclusion	65

CHAPITRE III : Isolement, sélection et évaluation de l'efficacité des *Pseudomonas* spp. fluorescents antagonistes in vivo

I- Introduction	70
II- Matériel et méthodes	72
1- Isolement des <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents et de la flore rhizosphérique totale	72
1.1- Prospection et prélèvements des échantillons	72

1.2- Analyse des échantillons	73
a- Isolement à partir du SR.....	73
b- Isolement à partir du RH.....	74
c- Isolement à partir de l'ER	74
1.3- Purification et conservation des PF	74
2- Sélection <i>in vitro</i> des <i>P. spp.</i> fluorescents antagonistes	75
2.1- Préparation des cultures des <i>P. spp.</i> fluorescents.....	75
2.2- Préparation de l'inoculum de <i>C. m. subsp. michiganensis</i>	75
2.3- Evaluation de l'antagonisme <i>in vitro</i> par contact direct	75
2.4- Sélection, purification et conservation des antagonistes potentiels	75
3- Evaluation de la colonisation racinaire par les antagonistes sélectionnés	76
3.1- Préparation des mutants résistants aux antibiotiques	76
3.2- Préparation et bactérisation des semences	76
3.3- Préparation du substrat et semi des graines bactérisées	77
3.4- Evaluation de la colonisation des racines	77
4- Evaluation du contrôle du chancre <i>in vivo</i>	77
4.1- Test des cotylédons.....	77
4.2- Contrôle du chancre en pots sous serre.....	78
4.3- Contrôle du chancre dans les conditions de production de la tomate.....	79
4.3.1- Bactéries utilisées.....	79
4.3.2- Production de semences de tomate contaminées par <i>C. m. subsp michiganensis</i> et infestation de la serre d'essai.....	80
4.3.3- Bactérisation des semences.....	81
4.3.4- Semi des graines et conditions de culture	81
4.3.5- Conduite de l'essai <i>in vivo</i>	81
5- Effet de certains facteurs abiotiques sur la croissance des isolats RN 39e et RN 69	83
5.1- Préparation de l'inoculum	83
5.2- Etude de l'effet de la température.....	83
5.3- Etude de l'effet du pH.....	84
5.4- Etude de l'effet des sels (NaCl, KCl et Na ₂ SO ₄).....	84
6- Analyses statistique.....	84
III-Résultats et discussion	85
1- Dénombrement des <i>P. spp.</i> fluorescents et de la flore totale	85

2- Screening des isolats de <i>P. spp.</i> fluorescents à base de leur antagonisme <i>in vitro</i>	87
3- Colonisation des racines par les <i>P. spp.</i> fluorescents sélectionnés.....	89
4- Evaluation du contrôle du chancre <i>in vivo</i>	91
4.1- Test des cotylédons.....	91
4.2- Contrôle du chancre en pots sous serre.....	93
4.3- Contrôle du chancre dans les conditions de production de la tomate.....	94
4.4- Evaluation de la vigueur des plantes en présence des isolats antagonistes testés..	95
5- Effet des facteurs abiotiques sur la croissance des isolats RN 39e et RN 69	98
5.1- Effet de la température.....	99
5.2- Effet du pH	99
5.3- Effet des sels.....	100
IV- Conclusion et perspectives.....	102

CHAPITRE IV. Identification des *Pseudomonas spp.* fluorescents antagonistes sélectionnées

I- Introduction.....	104
II-Matériels et méthodes.....	105
1- Identification génotypique	105
1.1- Extraction de l'ADN bactérien	105
1-2- Analyse des séquences de l'ADNr 16 S et du <i>rpoB</i>	107
2- Caractères phénotypiques	110
III- Résultats et discussion.....	113
1- Identification génotypique des huit isolats sélectionnées	114
2- Caractères phénotypiques des huit isolats sélectionnées	123
IV- Conclusion et perspectives.....	126

CHAPITRE V. Utilisation des plantes aromatiques et médicinales comme moyen de contrôle du chancre bactérien de la tomate

I. Introduction.....	127
II. Matériel et méthodes	129
1- Prospection et collecte du matériel végétal.....	129
2- Préparation des extraits aqueux	129

3-Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits de plantes	129
3.1- Préparation des cultures bactériennes	129
3.2- Activité antibactérienne <i>in vitro</i>	129
4- Détermination des CMI et des CMB	130
4.1- Détermination des CMI.....	130
4.2- Détermination des CMB	130
5- Effet des extraits aqueux sur la population du pathogène à la surface des semences. ...	130
6- Effet des meilleurs extraits sur la germination des semences.....	131
7- Screening phytochimique des PAM	131
7.1- Séparation par CCM.....	132
7.2- Dosage des phénols totaux	132
7.3- Dosage des flavonoïdes.....	133
7.4- Evaluation de l'activité antioxydante	133
8- Analyse statistique	134
III. Résultats	134
1- Prospection et collecte du matériel végétal.....	134
2- Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits des plantes	134
3- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB)	139
4- Effet du traitement des semences par les PAM sur la population de l'agent pathogène	140
5- Evaluation du pouvoir germinatif des semences traitées par les extraits des plantes.....	141
6- Screening phytochimique des PAM	142
6.1- Chromatographie sur couche mince (CMM)	142
6.2- Dosage des phénols totaux, des flavonoïdes et de l'activité antioxydante	143
IV- Discussion	145
V- Conclusion et perspectives.....	152
Conclusions générales et perspectives	154
Références bibliographiques.....	158
Annexes	187

%	: pourcentage	m	: mètre
°C	: degré Celsius	M	: molaire
µg	: microgramme	mg	: milligramme
µm	: micromètre	ml	: millilitre
ADN	: Acide désoxyribonucléique	mm	: millimètre
AFLP	: amplified fragment-length polymorphism	mM	: millimolaire
AHC	: acides hydroxycinnamiques	mn	: minute
ANOVA	: analyse de variance	NBY	: Nutriment Broth Yeast medium
AP-PCR	: Arbitrarily primed PCR	nm	: nanomètre
ARDRA	: amplified ribosomal DNA restriction analysis	ONSSA	: office national de la sûreté et la sécurité alimentaire
ARISA	: Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis	ORMVA	: office régionale de mise en valeur agricole
ARNr	: Acide ribonucléique ribosomal	PAM	: plantes aromatiques et médicinales
C.m.m.	: <i>C. m. subsp. michiganensis</i>	pb	: paire de base
CCM	: chromatographie sur couches minces	PCR	: réaction de polymérisation en chaîne
cm	: centimètre	PGPR	: plant growth promoting rhizobacteria
CMB	: concentration minimale bactéricide	RAPD	: random amplified polymorphic DNA
CMI	: concentration minimale inhibitrice	REP-PCR	: repetitive element palindromic PCR
DAF	: DNA amplification fingerprinting	RFLP	: restriction fragment length polymorphism
DGGE	: denaturing gradient gel electrophoresis	RH	: rhizoplan
Dh	: dirham	RISA	: Ribosomal Intergenic Spacer analysis
DO	: densité optique	s	: secondes
DPPH	: 2,2 diphenyl 1 picryl hydrazyl	SD	: small difference
EAC	: équivalent acide caféique	spp.	: plusieurs espèces
ELISA	: Enzyme linked immuno-sorbant assay	SR	: sol rhizosphérique
ER	: endorhizosphère	SSCP	: single strand conformation polymorphism
ER	: équivalent rutine	t	: tonne
FAO	: Food and agriculture Organization	TEAC	: trolox equivalent antioxydant capacity
g	: gramme	TGGE	: Temperature Gradient Gel Electrophoresis
h	: heure	Tmax	: température maximale
ha	: hectare	Tmin	: température minimale
HPLC	: High pressure liquid chromatography	T-RFLP	: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
HR	: humidité relative	UFC	: unité formant colonie
HS	: réaction d'hypersensibilité	UV	: ultra violet
IAV	: institut agronomique et vétérinaire	v/v	: volume par volume
ITS	: intergenic spacer	w/v	: poids par volume
Kb	: kilobase	ZI	: zone d'inhibition
KB	: King B	Φ	: le diamètre
Kg	: kilogramme		
l	: litre		

LISTE DES FIGURES

Figure I.1 : Position des feuilles et des fleurs sur un jeune plant de tomate.....	5
Figure I.2 : Inflorescence de la tomate (A) et coupe longitudinale d'une fleur isolée (B).....	5
Figure I.3 : Principales formes du fruit de la tomate cultivée: (1): aplatie; (2): ronde; (3) : globuleuse; (4): allongée; (5): cordée; (6): cylindrique; (7): piriforme; (8): très allongée (d'après El Fadl et Chtaina, 2010).....	6
Figure I.4 : Production mondiale de la tomate en 2009 (Anonyme 2).....	12
Figure I.5 : Les principaux exportateurs mondiaux en 2009 (D'après COMTRADE, cité par Anonyme 3).....	12
Figure I.6 : Evolution de la production de la tomate au Maroc (Anonyme 2).....	13
Figure I.7 : Evolution des exportations marocaines en tomate transformée (D'après COMTRADE, cité par Anonyme 3).....	14
Figure I.8 : Evolution de la production (A), des superficies (B) et des exportations (C) de la tomate primeur dans la région Souss-Massa Draa. (Anonyme 1).....	15
Figure I.9 : L'arbre phylogénique dérivé de la séquence de l'ADNr 16S de certaines espèces de microbacteriaceae.....	18
Figure I.10 : Morphologie des cellules de <i>C. m. subsp. michiganensis</i>	19
Figure I.11 : Symptômes de l'infection systémique des plants de tomate par <i>C. m. subsp. michiganensis</i>	21
Figure I.12 : Symptômes de l'infection localisée par <i>C. m. subsp. michiganensis</i>	22
Figure I.13 : Cellules bactériennes observées au niveau des tissus vasculaires d'une tige de tomate infectée.....	23
Figure I.14 : Cycle de la maladie du chancre bactérien de la tomate (d'après de León <i>et al.</i> 2011 et adapté à partir d'Eichenlaub <i>et al.</i> 2006).....	25
Figure I.15 : Composition du ribosome des procaryotes et de l'opéron de l'ADNr (Huybens <i>et al.</i> 2009).....	44
Figure I.16 : Schéma illustratif du fonctionnement de la base de données PseudoMLSA (Bennasar <i>et al.</i> 2010).....	50
Figure II.1 : Les terrines alvéolées placées dans une chambre de culture à condition contrôlées (photopériode de 12 h, une T°max de 28°C, une T°min de 10°C et une humidité relative (HR) de 80%).....	57

Figure II.2 : Les plantules de tomate au stade première vraie feuille après 4 jours du semis.....	57
Figure II.3 : Isolement de <i>C. m. subsp. michiganensis</i> à partir des tiges de tomate présentant des symptômes du chancre bactérien. A : Premier isolement. B : Purification par la méthode d'épuisement sur NBY. C : purification sur SCM.....	59
Figure II.4 : Réactions d'hypersensibilité sur feuilles de Tabac avec les trois isolats CmmJS07, CmmH195 et Cmm1.....	61
Figure II.5 : Test de dessèchement des cotylédons réalisé avec des plantules de tomate de quatre jours après la germination et l'isolat CmmJ07.....	61
Figures II.6 : Pourcentage des cotylédons desséchés après inoculation avec les quatre isolats pathogènes de <i>C. m. subsp. michiganensis</i> . Les cotylédons du témoin négatif traité avec l'EDS n'ont pas desséché tout le long de l'essai.....	62
Figure II.7 : Taches nécrotiques au centre (Flèches noires) en œil d'oiseaux sur fruits de tomate induites par l'application de l'isolat CmmJS07 (18 jours après l'infection).....	62
Figure II.8 : Flétrissement des plantes dont les racines ont été infectés par pulvérisation des suspensions (10^8 ufc ml ⁻¹) des isolats testés du pathogène.....	64
Figure II.9 : Flétrissement des plantules après inoculation des racines avec une suspension de l'isolat CmmJS07 et de l'isolat de référence CmmH195.....	64
Figure III.1 : Serre utilisée pour la réalisation du test <i>in vivo</i> avec les deux meilleurs isolats RN69 et RN 39e.....	80
Figure III.2 : Les symptômes du chancre bactérien de la tomate. A : Flétrissement unilatéral d'un plant. B et C : Flétrissement généralisé de tout la plante. D : Brunissement et nécroses des bordures des feuilles. E : Chancres sur tiges. F : Brunissement des tissus vasculaires. G : petites taches blanches en œil d'oiseau sur fruit. (Photos prises par l'équipe de phytopathologie et lutte Intégré, Faculté des sciences Agadir lors de ce travail).....	81
Figure III.3: Dénombrement des PF et de la flore bactérienne cultivable dans le sol rhizosphérique (SR), le rhizoplan (RH) et l'endorhizosphère (ER). * : par gramme du sol sec pour le SR et par gramme de racines fraîches pour RH et ER.....	85
Figure III.4: Répartition des <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents selon leur origine. RS : sol rhizosphérique, RH : rhizoplan et ER : endorhizosphère.....	86
Figure III.5: Inhibition de la croissance de <i>C. m. subsp. michiganensis</i> en présence de deux isolats de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents RN 63 (A) et RN 47e (B) sur milieu NBYA à 26°C après 4 jours de co-culture.....	89
Figure III.6 : Colonisation des racines des plantules de tomate par un isolat de <i>Pseudomonas</i> fluorescent antagoniste de <i>C. m. subsp. michiganensis</i> . Observation sous lumière naturelle...89	89
Figure III.7 : Colonisation racinaire (pourcentage des plantules avec racines colonisées) par les pseudomonas fluorescents. Les barres avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $P \leq 0.05$	90

Figure III.8 : Schéma d'un bloc du test des cotylédons avec les isolats RN39e, RN130, RN42b, RN47e et RN53b.....	92
Figure III.9 : Effet de la variation du pH sur la croissance des isolas RN 69 et RN 39e. La croissance est exprimée en DO à 640 nm.....	100
Figure IV.1 : Identification de la bactérie RN69 par la galerie API20 NE ; A) galerie non ensemencée, B) galerie ensemencée par RN69 et incubée pendant 24 h et C) lecture des résultats (profil numérique de la bactérie).....	112
Figure IV.2 : Fluorescences de quatre isolats <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents observés sous une lumière UV à 365 nm.....	113
Figure IV.3 : Réactions négatives d'hypersensibilité sur feuilles de tabac.....	113
Figure IV.4 : Electrophorèse des produits de la PCR sur gel d'agarose 1%. Les flèches indiquent les bandes de 1500 kb de l'ARN 16S et celle de 400 pb polymérisées chez les huit isolats étudiés.....	114
Figure IV.5 : Exemples d'arbres phylogéniques des isolats basés sur les séquences du gène de l'ARNr 16 S.....	116-118
Figure IV.6 : Exemples d'arbres phylogéniques des isolats RN39e, RN42b, RN69 et RN130 basés sur l'analyse des séquences du gène <i>rpoB</i>	120-121
Figure V.1: Inhibition de la croissance de <i>C. m. subsp. michiganensis</i> par les extraits aqueux de certaines plantes aromatiques testées pendant cette étude. A: Témoin. B: <i>Lavandula coronopifolia</i> (101). C: <i>Cistus monspeliensis</i> (114). D: <i>Lavandula coronopifolia</i> (78). E: <i>Rubus ulmifolius</i> (07). F: <i>Anvillea radiata</i> (83). G: <i>Lavandula stoechas</i> (25). H: <i>Pistacia atlantica</i> (26). I: <i>Rosa canina</i> (43).....	136
Figure V.2 : Les trois catégories de plantes dont les extraits inhibent la croissance de <i>C. m. subsp. michiganensis</i> . Les résultats sont analysés avec une ANOVA suivie par le test de Newman & Keuls à $P < 0.05$. Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.....	137
Figure V.3 : Inhibition de la croissance de <i>C. m. subsp. michiganensis</i> par les plantes (catégorie I). Les résultats sont analysés avec une ANOVA suivie par le test de Newman & Keuls à $P < 0.05$. Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.....	137
Figure V.4 : Inhibition de la croissance de <i>C. m. subsp. michiganensis</i> par les extraits de plantes (catégorie II). Les résultats sont analysés avec une ANOVA suivie par le test de Newman & Keuls à $P < 0.05$. Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.....	138
Figure V.5: Inhibition de la croissance de <i>C. m. subsp. michiganensis</i> par des extraits de plantes (catégorie III). Les résultats sont analysés avec une ANOVA suivie par le test de Newman & Keuls à $P < 0.05$. Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.....	139
Figure V.6 : Effet des extraits aqueux des meilleures plantes sur la population de l'agent pathogène à la surface de semences de tomate inoculées artificiellement. Les résultats sont	

analysés avec une ANOVA suivie par le test de Newman & Keuls à $P < 0,05$. Des lettres différentes indiquent des résultats significativement différents.....**141**

Figure V.7: Effet des extraits aqueux de certaines PAM sur la germination des semences de tomate. Les résultats sont analysés avec une ANOVA suivie par le test de Newman & Keuls à $P < 0,05$. Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.....**142**

Figure V.8 : Profils chromatographiques des PAM étudiées: *Lavandula coronopifolia* (78); *Rubus ulmifolius* (7); *Rosa canina* (43); *Pistacia atlantica* (26); *Anvillea radiata* (83); *Cistus crispus* (107); *Lavandula stoechas* (25); *Ighermia pinifolia* (65); (T1: Rutine ; T2: acide chlorogénique).....**143**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1: Classes de calibre de la tomate conventionnelle.....	7
Tableau I.2 : Classes de calibre de la tomate cerise.....	8
Tableau I.3 : Composition d'un fruit mûr de tomate (David et Hobson, 1981).....	10
Tableau I.4 : Teneur en vitamines d'un fruit mûr de tomate (David et Hobson, 1981).....	10
Tableau I.5 : les principales maladies de la tomate.....	16
Tableau I.6 : Evolution de la nomenclature de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Gleason et al., 1993).....	17
Tableau I.7 : Symptômes causé par <i>C. m.</i> subsp. <i>michiganensis</i> l'agent causal du chancre bactérien de la tomate.....	22
Tableau I.8 : Sensibilité de l'isolement et de la sérologie pour la détection de <i>C. m.</i> subsp. <i>michiganensis</i> (d'après De León et al. 2011).....	28
Tableau I.9 : Les amorces de la PCR et de la RT-PCR désignées pour la détection de <i>C. m.</i> subsp. <i>michiganensis</i> (De León et al. 2011).....	29
Tableau I.10 : Quelques exemples récents d'agents de contrôle biologiques à base de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents (depuis 2004).....	33
Tableau I.11 : Exemples de bio-pesticides commercialisés, formulés à base de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents agent de contrôle biologiques des pathogènes des plantes.....	34
Tableau I-12 : Principales molécules toxiques synthétisées par certaines souches de <i>Pseudomonas fluorescens</i> et <i>Pseudomonas putida</i>	41
Tableau I.13 : Les avantages et les inconvénients des différentes méthodes moléculaires utilisées pour l'identification et l'étude des procaryotes (D'après Huybens et al. 2009).....	48
Tableau II.1 : Résultats de la prospection réalisée dans de la région du Souss-Massa Draa.....	60
Tableau II.2 : Capacité de 4 isolats de <i>C. m.</i> subsp. <i>michiganensis</i> à produire des taches nécrotiques sur fruits de tomate.....	63
Tableau II.3 : Evaluation du pouvoir pathogène de quatre isolats de <i>C. m.</i> subsp. <i>michiganensis</i> , selon quatre tests différents.....	65
Tableau III.1 : les dilutions utilisées pour chaque milieu de culture.....	74

Tableau III.2: Répartition des <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents antagonistes selon leur origine et leur groupe d'inhibition.....	88
Tableau III.3 : tableau des résultats du test des cotylédons avec les 42 isolats antagonistes.....	92
Tableau III.4: Effet des isolats antagonistes sélectionnés sur l'incidence du chancre bactérien de la tomate (en pots sous serre).....	94
Tableau III.5: Réduction in vivo de l'incidence du chancre bactérien de la tomate par les deux isolats de <i>Pseudomonas</i> fluorescents RN39e et RN69. (Essai en champ sous serre).....	95
Tableau III.6 : Effet des isolats RN 39e et RN 69 sur la hauteur moyenne des tiges des plantules de tomate.....	96
Tableau III.7 : Effet des isolats RN 39e et RN 69 sur le diamètre au collet des plantules de tomate un mois après la transplantation.....	96
Tableau III.8 : Effet des isolats RN 39e et RN 69 sur le poids sec des racines et des tiges ainsi que le poids frais des plantules de tomate après un mois de la transplantation.....	96
Tableau III.9 : Effet de la variation de la température sur la croissance des isolats RN 39e et RN 69.....	99
Tableau III.10 : Effet de variation de la concentration des sels (NaCl, Na ₂ SO ₄ et KCl) sur la croissance des isolats RN 39e et RN 69. La croissance est exprimée en DO à 640 nm.....	101
Tableau IV.1: Amorces utilisées pour amplifier les gènes de l'ARNr 16S et du rpoB des huit <i>P. fluorescents</i> retenus.....	107
Tableau IV.2 : Réactifs utilisés lors des réactions PCR.....	107
Tableau IV.3 : Conditions des cycles de dénaturation-hybridation-élongation lors des réactions de la PCR.....	108
Tableau IV.4 : Conditions de la réaction de séquençage.....	109
Tableau IV.5 : Conditions des cycles de dénaturation-hybridation-élongation lors du séquençage.....	109
Tableau IV.6 : Les tests de la galerie API20 NE.....	111
Tableau IV.7 : Concentrations des échantillons d'ADN extraits des isolats bactériens. Concentrations estimées avec le Nanodrop 8000.....	114
Tableau IV.8 : Similarité des séquences de l'ARNr 16S des huit <i>Pseudomonas</i> aux séquences des espèces les plus proches.....	115
Tableau IV.9 : Similarité des séquences du gène rpoB des huit isolats <i>Pseudomonas</i> aux séquences des espèces les plus proches.....	120

Tableau IV.10 : Résumé de l'analyse des gènes <i>ARN16S</i> et <i>rpoB</i> des isolats RN47, RN 69 et RN 130.....	122
Tableau IV.11-a: Caractères phénotypiques déterminés par la galerie API 20NE de quatre isolats proches l'espèce <i>P. azotoformans</i>	124
Tableau IV.11-b: Caractères phénotypiques déterminés par la galerie API 20NE de quatre isolats proches de l'espèce <i>P. plecoglossicida</i>	125
Tableau V.1 : Les couleurs fluorescentes des principaux composés secondaires des plantes après leur révélation avec le réactif de Neu.....	132
Tableau V.2: Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits de plantes vis-à-vis de <i>C. m. subsp. michiganensis</i>	135
Tableau V.3: Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) exprimées en mg ml ⁻¹ des extraits aqueux qui ont donné les meilleurs pourcentages d'inhibition de l'agent pathogène.....	140
Tableau V.4: Teneur en phénols totaux, en flavonoïdes et activité antioxydante des plantes aromatiques et médicinales sélectionnées pour leur activité antibactérienne vis-à-vis de l'agent du chancre bactérien de la tomate ^a	144
Tableau V.5: Les indices de Corrélation (R) et de détermination (R ²) entre la teneur en phénols (Ph), la teneur en flavonoïdes (Flav), la capacité antioxydante (TEAC) et l'activité antibactérienne des extraits aqueux (diamètres des zones d'inhibition) (ZI).....	144

Introduction Générale

La culture de la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) est la plus répandue à travers le monde. Au Maroc, elle occupe une place privilégiée parmi les cultures maraîchères et joue un rôle socio-économique important dans le développement du pays. A l'échelle nationale, la région de Souss-Massa-Drâa se situe au premier rang aussi bien sur le plan production que sur le plan exportation (ORMVA, 2012). La tomate est sujette à l'attaque par une multitude de microorganismes pathogènes. En effet, sa culture intensive a généré et a amplifié les problèmes phytosanitaires d'origine microbienne (Boudyach, 2004). Outre les champignons et les virus, les bactéries pathogènes entraînent une réduction importante de la qualité et du rendement de cette culture (Gartemann *et al.* 2003). Le chancre bactérien causé par *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith), compte parmi les principaux problèmes phytosanitaires de la tomate (Davis *et al.* 1984). C'est une maladie très contagieuse et destructive aussi bien sous serre qu'en plein champ (Utkhede et Koch, 2004). Le chancre bactérien peut causer d'importants dégâts qui peuvent aller jusqu'à la destruction de 100% des récoltes (Gitaitis, 1990; Chang *et al.* 1992 a; Boudyach *et al.* 2001). Au Maroc, toutes les zones de production de la tomate sont contaminées par cet agent pathogène, dont la sévérité varie d'une région à l'autre (Fatmi *et al.* 1984). Dans la région Souss-Massa, il est devenu la principale cause de la mort prématurée des plants de tomate et de la réduction des rendements (Fatmi, 1989 ; Boudyach, 2004). Les semences et les transplants infectés constituent la principale source d'inoculum primaire de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Bryan, 1930 ; Fatmi *et al.* 1991 ; Gleason *et al.* 1991). La bactérie peut survivre aussi bien dans le sol (Bryan, 1930; Chang *et al.* 1992 b; Strider, 1967; Farley, 1971) que dans les résidus de cultures et possède plusieurs hôtes alternatifs (Fatmi et Schaad, 2002). La dissémination de la maladie est assurée par diverses manipulations tels que la transplantation (Gitaitis, 1990 ; Gitaitis *et al.* 1991), les traitements phytosanitaires et l'irrigation (Strider, 1969 ; Chang *et al.* 1992 c). Les traitements chimiques préconisés, pour lutter contre cette maladie, ne font que réduire la population du pathogène à la surface des plants infectés (Hausbeck *et al.* 2000). La prévention constitue la première ligne de défense. Etant donné l'inefficacité des traitements chimiques et leur répercussion sur la santé et l'environnement, la recherche et le développement de méthodes de lutte alternatives à la lutte chimique sont recommandés. La lutte biologique est une voie prometteuse et les nombreux travaux de recherche réalisés, un peu partout dans le monde, sur différents agents pathogènes ont abouti à des résultats encourageants. La lutte biologique par protection du système racinaire, en y introduisant des bactéries non pathogènes antagonistes de *C.m.m.*, constitue une alternative

potentielle. En effet, la possibilité de rendre un sol suppressif à une maladie en y introduisant des microorganismes s'avère très prometteuse, surtout à une époque où les traitements phytosanitaires à base de produits chimiques de synthèse suscitent une méfiance de plus en plus grande (Lugtenberg *et al.* 1991). La rhizosphère est la zone d'interaction entre le sol, la plante et les microorganismes (Lynch, 1990). La capacité des *Pseudomonas* fluorescents de coloniser rapidement cette rhizosphère fait de ces bactéries un groupe taxonomique de grand intérêt en lutte biologique. Weller *et al.* (1988) ont isolé des *Pseudomonas* spp. fluorescents qui contrôlent la pourriture du blé, causée par *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, en rendant le sol suppressif à ce pathogène et ceci par la production des antibiotiques et/ou des sidérophores. Loper (1988), a montré que la souche 3551 de *P. fluorescens migula* isolée de la rhizosphère d'un plant de Coton secrète un pigment fluorescent (sidérophore) qui inhibe le champignon *Pythium ultimum*, agent causal de la fonte des semis de la plupart des plantes. Plusieurs autres études (Howell et Stipanovic, 1980 ; Yuen *et al.* 1985 ; Deweger *et al.* 1988 ; Becker et Cook, 1988 ; Gees et Coffey, 1989 ; Mercado-Blanco *et al.* 2004 ; Boudyach, 2004 ; Bardas *et al.* 2009 ; Abo-Elyousr *et al.* 2009 ; Liu *et al.* 2009 ; Gandhi et Saravanakumar, 2009 ; Validov *et al.* 2009 ; Anitha et Arun Das, 2011) ont montré que les *Pseudomonas* spp. fluorescents isolés de la rhizosphère des plantes peuvent être utilisés comme agents de contrôle biologique de plusieurs pathogènes.

Outre l'utilisation des microorganismes antagonistes, l'utilisation des substances naturelles extraites des plantes constitue l'un des axes privilégiés de la lutte biologique contre les pathogènes des plantes. Récemment des études ont prouvé l'efficacité des extraits des plantes médicinales et aromatiques dans le contrôle des agents phytopathogènes aussi bien en culture qu'en poste-récolte (Talibi *et al.* 2011 ; Sarah *et al.* 2012 ; Zarins *et al.* 2009 ; Park *et al.* 2008 ; Joseph *et al.* 2008 ; Pouvova *et al.* 2008 ; El Allagui *et al.* 2007 ; Basim *et al.* 2006 ; Hernandez *et al.* 2005 ; Cakir *et al.* 2005 ; Daferera *et al.* 2003 ; Ismam, 2000). Ismam (2000) a rapporté que certaines huiles essentielles, fréquemment utilisées comme fragrances en cosmétique et en industrie alimentaire, sont réputées pour leur action répulsive vis-à-vis des insectes. Des investigations récentes, effectuées dans plusieurs pays, ont confirmé les activités insecticide, fongicide et bactéricide des huiles essentielles et de différents extraits de plantes, contre quelques importants ravageurs et pathogènes des plantes cultivées. Daferera *et al.* (2003) ont montré que les huiles essentielles de huit plantes aromatiques et médicinales ont une action bactéricide et fongicide sur plusieurs agents pathogènes dont celui responsable du chancre bactérien de la tomate. Sarah *et al.* (2012) ont montré que les extraits

méthanoliques des feuilles de *Psidium guajava* L. ont une activité inhibitrice significative contre deux phytopathogènes *Xanthomonas* sp. et *Pectobacterium* sp. Park *et al.* (2008) ont rapporté que les extraits méthanoïques de 27 plantes aromatiques et médicinales ont une activité fongicide envers plusieurs champignons pathogènes des plantes cultivées. L'efficacité des extraits varie en fonction de l'agent pathogène, de la partie utilisée de la plante, de la méthode d'extraction adoptée et de l'espèce végétale. Joseph *et al.* (2008) ont montré que les extraits aqueux de cinq plantes ont une activité antifongique envers *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* agent causal du flétrissement de l'aubergine. Récemment, les extraits aqueux et organiques de plusieurs plantes aromatiques et médicinales du sud Marocain ont contrôlé le développement des principaux champignons pathogènes des agrumes en post-récolte (Askarne *et al.* 2013, Askarne *et al.* 2012 ; Talibi *et al.* 2012 a et b).

Le présent travail entre dans le cadre de la lutte biologique contre le chancre bactérien de la tomate. Nos investigations ont porté sur :

- la mise au point d'un procédé d'isolement, de sélection et d'évaluation des bactéries antagonistes à *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* et appartenant au groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents ;
- la sélection parmi les plantes aromatiques et médicinales, récoltées dans le sud du Maroc, celles dont les extraits inhibent la croissance de ce pathogène. Ceci dans le but de mettre au point une alternative biologique aux traitements chimiques afin de diminuer la population du pathogène au niveau des semences et limiter les dégâts qu'il cause aussi bien en pépinière que sous serre.

CHAPITRE I

Etude Bibliographique

I-Aperçu général sur la culture de la tomate

1- Taxonomie

La tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill., est une plante appartenant à la grande famille des Solanacées qui regroupe plusieurs espèces, telles que la pomme de terre, le tabac, le poivron et l'aubergine. C'est une espèce diploïde ($2n=24$), monoïque et allogame. De point de vue taxonomique, la systématique de la tomate peut être résumée comme suit :

Règne	: Végétal
Sous-Règne	: Cormophytes
Embranchement	: Spermaphytes
Sous-Embranchement:	Angiospermes
Classe	: Gamopétales
Ordre	: Polémoniales
Famille	: Solanacées
Genre	: <i>Lycopersicon</i>
Espèce	: <i>L. esculentum</i>

2- Description botanique de la plante

Selon la description de Berti (1989), la tomate est une liane annuelle, à port buissonnant dont la longueur peut dépasser plusieurs mètres. Elle porte de nombreuses feuilles velues alternes et composées, ainsi que plusieurs bourgeons latéraux et des inflorescences jaunes en grappes ou en bouquets qui peuvent être simples, doubles ou composées. Sa tige herbacée se lignifie rapidement avec l'âge de la plante et devient anguleuse (Figure I.1). Le système racinaire est fasciculé et puissant pouvant atteindre 1,50 m de profondeur et 0,70 m de largeur. Les fleurs sont bisexuées, régulières. Elles poussent opposées et/ou entre les feuilles. Le tube du calice est court et velu, les sépales sont persistants (Figure I.2). La plante est principalement autogame, mais la fécondation croisée peut avoir lieu ; les abeilles et les bourdons étant les principaux pollinisateurs. Les graines sont nombreuses, en forme de rein ou de poire. Elles sont poilues, beiges, de 3 à 5 mm de longueur et 2 à 4 mm de largeur. L'embryon est enroulé dans l'albumen (Shankara *et al.* 2005).



Figure I.1 : Position des feuilles et des fleurs sur un jeune plant de tomate.

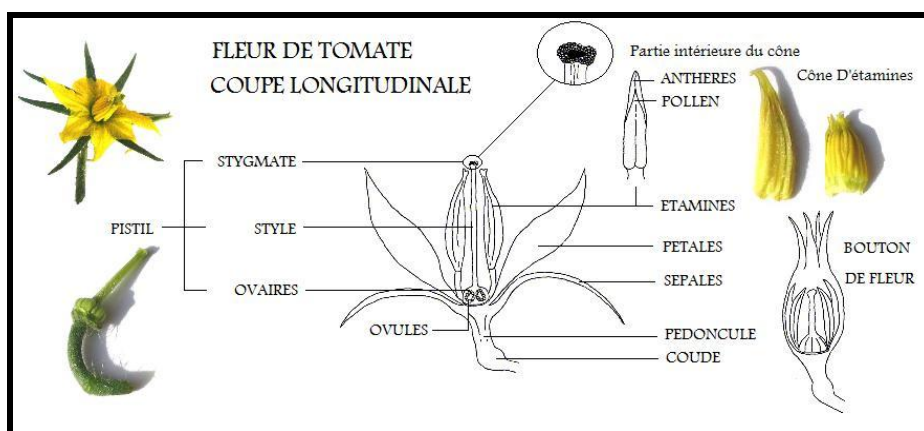


Figure I.2 : Inflorescence de la tomate (A) et coupe longitudinale d'une fleur isolée (B).

3- Origine de la tomate

Selon Jenkin (1948) et Rick (1956) cités par Purseglove (1982), l'ancêtre de la tomate actuellement cultivée serait l'espèce *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*. Cette plante a pour origine le Pérou et les régions tropicales de l'Amérique. Elle faisait partie de la flore native unique des îles Galápagos. La domestication de cette plante hors de sa zone d'origine fut réalisée durant les premières civilisations mexicaines. Elle a été par la suite introduite en Europe par les Espagnols vers la troisième décennie du 16ème siècle (en 1523). Après la

généralisation de cette culture en Europe, elle se propagea aux Etats-Unis d'Amérique au début du 18^{ème} siècle. Ce n'est qu'à la fin du 19^{ème} siècle que cette culture s'est répandue dans le reste du monde (Purseglove, 1982).

4- Les types variétaux de la tomate cultivée

La production de la tomate est généralement soumise aux critères commerciaux qui sont les plus déterminants pour cette culture. Les consommateurs, par leurs préférences, agissent aussi sur le choix des variétés mises en culture. En effet, l'achat des tomates se détermine avant tout sur des critères visuels et de fraîcheur, mais le prix ou l'arome sont également pris en compte par certaines catégories de clients. Bref, toutes les variétés de tomate présentes sur le marché sont assez bien identifiées en amont par la considération de tous ces facteurs. Chaque variété possède des formes bien déterminées (El Fadl et Chtaina, 2010). Les formes les plus représentées sont illustrées sur la figure I.3.

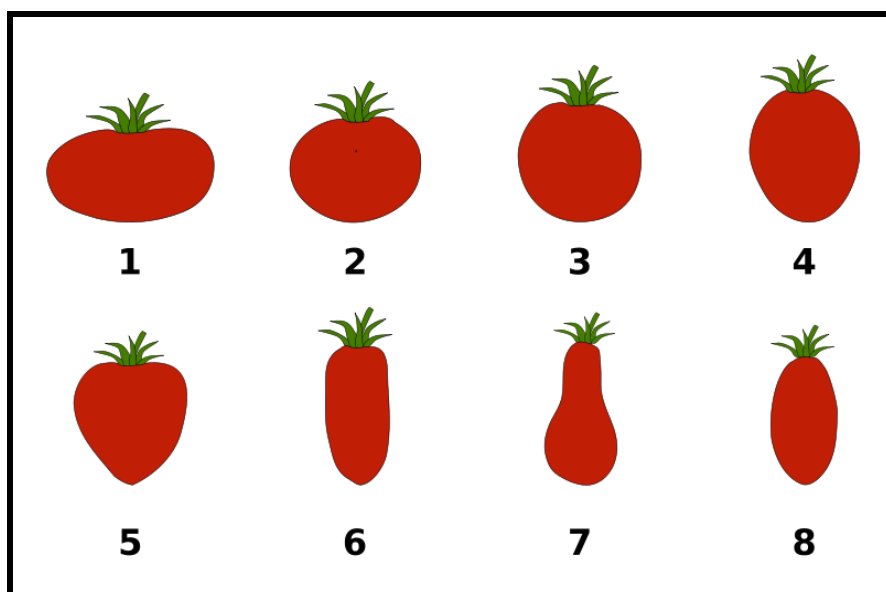


Figure I.3 : Principales formes de fruit de la tomate cultivée: (1): aplatie; (2): ronde; (3) : globuleuse; (4): allongée; (5): cordée; (6): cylindrique; (7): piriforme; (8): très allongée (d'après El Fadl et Chtaina, 2010).

D'après la synthèse d'El Fadl et Chtaina, 2010, les types variétaux de la tomate sont assez complexes à définir, car les critères utilisés intègrent de très nombreux paramètres à savoir : la forme, la couleur, le poids, le mode de croissance variétale, la destination du produit et les qualités gustatives. Les principaux types décrits dans la littérature sont :

La tomate ronde conventionnelle : il s'agit de la tomate la plus commune. Elle est de couleur rouge unie. La maturation au niveau des bouquets est généralement progressive. Ce qui donne des fruits de différents calibres. Le tableau I.1 illustre les classes de calibre qu'on peut avoir dans ce type de tomate. Le poids des fruits est compris entre 100 et 300 g par fruit.

Tableau I.1 : Classes de calibre de la tomate conventionnelle.

Calibre	Diamètre du fruit (ϕ , en mm)
0	$\phi \geq 102$
1	$82 \leq \phi < 102$
2	$67 \leq \phi < 82$
3	$57 \leq \phi < 67$
4	$47 \leq \phi < 57$
5	$40 \leq \phi < 47$
6	$35 \leq \phi < 40$
7	$30 \leq \phi < 35$

La tomate grappe : Ce type variétal doit son nom au mode de récolte et de commercialisation, souvent en grappe de 6 à 16 fruits environ. Il se distingue du premier type par la maturation groupée des fruits constituant la même grappe. La taille des fruits est homogène, elle appartient aux classes de calibre 4 et 5 (40 à 60 mm de diamètre). Le poids de chaque fruit varie entre 50 et 120g. Les fruits sont généralement pulpeux, très savoureux et parfumés. La production de ce type de type est concentrée dans la région du Souss-Massa Draa. Le tonnage assuré par les producteurs de cette région varie entre 5 et 10% par rapport aux exportations totales de la tomate.

La tomate cerise : Cette tomate se caractérise par la taille de ses fruits. Une grappe de tomate cerise compte, en fonction des variétés, entre 20 et 60 fruits. Un plant de tomate cerise peut produire jusqu'à 25 grappes. Le poids individuel des fruits varie, en général, entre 10 et 20 g. Les formes de la tomate cerise sont variables : elles peuvent être rondes, allongées pointues ou allongées plates. Le conditionnement appliqué à la tomate cerise est basé sur le calibre. Généralement, quatre classes de calibres peuvent être différenciées (Tableau I.2).

Tableau I.2 : Classes de calibre de la tomate cerise.

Calibre	Diamètre du fruit (ø, en mm)
Petit	20 à 25
Moyen	25 à 30
Gros	30 à 35
Hors Calibre	Très petit

La demande des marchés extérieurs en termes de tomate cerise fait que les superficies réservées à ce type de tomate est en perpétuelle expansion. A peu près 50000 tonnes de tomate cerise ont été exportées en 2009-2010, soit 15% environ du total de la tomate exportée. Les consommateurs français sont les utilisateurs de ce type de tomate. La consommation est presque exclusivement en cru. Sauf bien sur l'utilisation locale de ce type de tomate dans la préparation de quelques plats typiquement berbères (notamment le couscous dans les régions d'Agadir, Tiznit et Tafraoute).

La tomate Cocktail : elle est plus grosse que la tomate cerise. Le poids moyen du fruit oscille entre 20 et 30g. Elle est très parfumée et juteuse. Elle est cultivée en réponse à des demandes commerciales bien déterminées.

La tomate allongée (kiwat) : elle se présente sous une forme longue caractéristique. Elle est pulpeuse et peu juteuse. Les réalisations à l'export montrent que 2000 à 4000 tonnes de tomate kiwat sont expédiées annuellement à partir de la région de Souss-Massa Draa.

La tomate industrielle : C'est une tomate à croissance déterminée qui se caractérise par un plant de type buisson. Les fruits ont une teneur élevée en matière sèche. La forme des fruits est ronde ou allongée. Le caractère dit : séparation aisée des fruits de la partie végétative, est très recherchée pour ce type de variété. Cette tomate est destinée principalement à la transformation.

Les types variétaux déjà cités appartiennent à différentes variétés commerciales. Les principales variétés commercialisés au Maroc sont Daniela (de High-tech) en cas d'absence de nématodes ; Gabriela (de High-tech) en cas de présence de nématodes. D'autres variétés sont disponibles sur le marché, et on en cite : Madrila (Agri matico) ; Clx qui se présente sous différents numéros ; Clause avec différents numéros ; Campbel...etc. Ces variétés sont en

perpétuelle évolution. Il est donc recommandé de suivre cette évolution sur le marché afin de bénéficier des dernières innovations (Anonyme, 1).

5- Valeur nutritive de la tomate

Le fruit de tomate est d'une grande valeur nutritive. Il est aussi très diététique. En effet, sa teneur en eau varie entre 93 et 95% (Shankara *et al.*, 2005). Les 5 à 7% qui restent sont constitués par les solides qui déterminent sa qualité et qui sont résumées comme suit :

- ♦ Les solides solubles : ils sont essentiellement des sucres réducteurs comme le glucose et le fructose ainsi que les acides organiques, les lipides, les minéraux et les pigments ;
- ♦ La partie insoluble : elle est composée de la cellulose, de l'hémicellulose, des pectines, et des polysaccharides. Ce sont ces constituants qui déterminent la viscosité des fruits. Cette viscosité influence la qualité du jus de tomate, du ketchup, des sauces, des soupes, et des pâtes issus de ces fruits.

Les pigments responsables de la couleur sont les caroténoïdes et la chlorophylle. La tomate fraîche est une source majeure de lycopène. C'est un antioxydant naturel aux vertus anticancéreuses, notamment dans le cas des cancers de la prostate (Lu *et al.* 2001 ; Durak *et al.* 2003), du poumon (Comstock *et al.* 2008), de la bouche et du colon (Goyal *et al.* 2009). Le lycopène sert aussi à combattre les maladies cardiovasculaires (Faure *et al.* 1999). Le tableau I.3 résume les principaux constituants de la matière sèche d'un fruit mûr de tomate. Les sucres représentent presque 50% de l'ensemble de la matière sèche. Les teneurs en vitamines montrent que le fruit de tomate est riche en vitamines variées (Tableau I.4). Il faut toutefois noter que les intervalles de variation sont parfois importants, expliquant les différentes qualités des cultivars. La vitamine C reste le constituant principal (Davies *et al.* 1981).

Martínez-Valverde *et al.* 2002, tout en étudiant neuf variétés commerciales de tomate, rapportent que les concentrations de lycopène et des différents composés phénoliques ainsi que l'activité antioxydante ont été fortement influencés par la variété analysée. La quercétine, flavonoïde le plus abondant, a été retrouvé à des concentrations comprises entre 7,19 et 43,59 mg kg⁻¹ de poids frais, tandis que la teneur de naringénine était inférieure à 12,55 mg kg⁻¹. L'acide hydroxy-cinnamique le plus abondant est l'acide chlorogénique, avec des valeurs allant de 14 à 32 mg kg⁻¹ de poids frais, l'acide caféique vient deuxième, tandis que l'acide p-coumarique et l'acide férulique ont des concentrations identiques inférieures à 5 mg kg⁻¹. La plus forte teneur en lycopène a été trouvée au niveau des variétés Ramillete, Pera et Durina (> 50 mg kg⁻¹ de poids frais), tandis que la concentration dans les autres variétés se situe entre 50

et 30 mg kg⁻¹, à l'exception de Liso (moins de 20 mg kg⁻¹). L'activité anti-oxydante des extraits de tomate varie avec la variété de tomate et le procédé de dosage utilisé. Les composés phénoliques corrélés significativement à la capacité antioxydante étaient le lycopène, l'acide férulique et l'acide caféique (Martínez-Valverde *et al.* 2002).

Tableau I.3 : Composition d'un fruit mûr de tomate (Davies *et al.* 1981).

Substances	% de matière sèche
Sucres	
Glucose	22
Fructose	25
Sacharose	1
Solides insolubles	
Protéines	8
Substances pectiques	7
Cellulose	6
Hémicellulose	4
Acides organiques	
Acide citrique	9
Acide malique	4
Minéraux	
Essentiellement K, Ca, Mg, P.	8
Autres	
Lipides	2
Acide amino dicarboxyliques	2
Pigments (caroténoïdes et chlorophylles)	0,4
Acide ascorbique (Vitamine C)	0,5
Substances volatiles	0,1
AA, vitamines et polyphénols	1

Tableau I.4 : Teneur en vitamines d'un fruit mûr de tomate (Davies *et al.* 1981).

Vitamines	Quantités
Vitamine A (β-carotène)	900 à 1271 UI
Vitamine B1 (thiamine)	50 à 60 µg/100g
Vitamine B2 (Riboflavine)	20 à 50 µg/100g
Vitamine B3 (acide pentothénique)	50 à 750 µg/100g
Complexe de Vitamine B6	80 à 110 µg/100g
Acide nicotinique (niacine)	500 à 700 µg/100g
Acide folique	6,4 à 20 µg/100g
Biotine	1,2 à 4 µg/100g
Vitamine C	15000 à 23000 µg/100g
Vitamine E (α-tocophérol)	40 à 1200 µg/100g

6- Importance économique de la tomate

La tomate est, après la pomme de terre, le légume le plus consommé dans le monde. Elle est consommée soit fraîche soit après transformation. Elle est cultivée sous toutes les latitudes et dans des conditions climatiques et de production très variées. Ceci démontre une grande plasticité et témoigne de l'efficacité du travail des sélectionneurs des variétés de ce fruit (légume !). L'importance économique de la culture de tomate peut être analysée à trois échelles : mondiale, nationale et régionale.

6.1- A l'échelle mondiale

Selon le rapport de la FAO (FAOSTAT, 2012, Anonyme 2), la tomate est le premier produit horticole dans le monde grâce à sa production. En effet, plus de 124 millions de tonnes ont été produites en 2009 (Anonyme 2). La Chine vient en premier rang avec une production de 45,36 millions de tonnes, suivie par les Etats-Unis d'Amérique avec 14,18 millions de tonnes. L'Inde est classé troisième avec une production de 11,14 millions de tonnes. A l'échelle du continent africain, l'Egypte est le premier producteur avec 10,27 millions de tonnes suivie du Maroc avec une production de 1,23 millions de tonnes (Figure I.4). Au cours du XXe siècle, La production mondiale de tomates n'a pas cessé de progresser régulièrement. Cette progression s'est accrue considérablement durant les trois dernières décennies malgré les aléas climatiques. Elle est passée de seulement 48 millions de tonnes en 1978, à 74 millions en 1992, 89 millions en 1998, et a atteint plus de 124 millions en 2009. Parmi les 14 pays qui ont produit un million de tonnes ou plus, sept sont largement au dessus de 5 millions de tonnes. Il est estimé que 30 % des tomates produites à l'échelle mondiale sont destinées à la transformation. Il faut noter toutefois que ce pourcentage diffère d'un pays à l'autre.

Les pays du bassin méditerranéen jouent un rôle primordial dans l'exportation de la tomate fraîche. En effet, la Turquie, l'Espagne et le Maroc exportent presque 26% des exportations globales de ce fruit (légume) (Figure I.5). Le Maroc occupe le cinquième rang parmi les exportateurs de la tomate fraîche avec 5% des exportations mondiales. Il vient après les Pays-Bas (avec 21%), le Mexique (avec 17%), la Turquie (avec 13%) et l'Espagne (avec 8%) (Figure I.5).

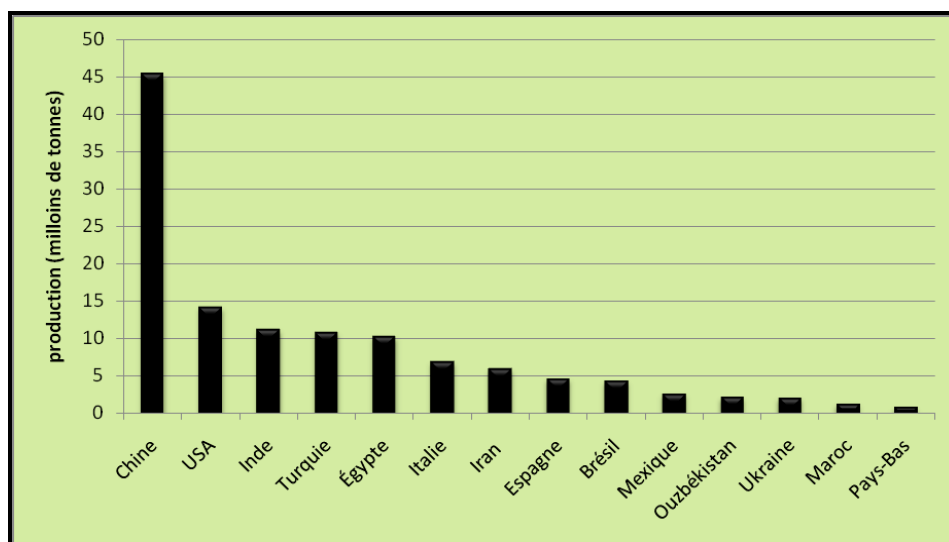


Figure I.4 : Production mondiale de la tomate en 2009 (Anonyme 2).

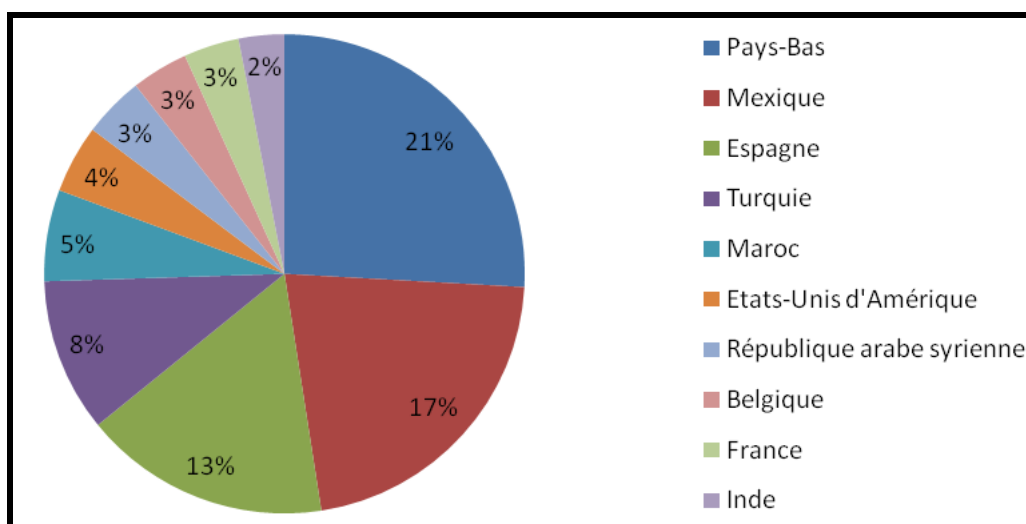


Figure I.5 : Les principaux exportateurs mondiaux en 2009 (D'après COMTRADE, cité par Anonyme 3).

6.2- A l'échelle nationale

Au Maroc la culture de tomate joue un rôle socio-économique important dans l'économie marocaine tant par les devises qu'elle génère (environ 3,5 milliards de dirhams par an), que par l'opportunité d'emploi qu'elle procure (plus de 15 millions de journées de travail par an). Elle vient en tête des cultures maraîchères en occupant une superficie globale de 18 642 ha, assurant une production totale qui dépasse 1,2 million de tonnes par an (Figure I.6). Cette production a représenté 14% de la production agricole globale au cours de la campagne 2005-2006 (Anonyme 2). Elle est composée de plus de 80% de tomates fraîches et représente 40% du total exporté des produits maraîchers. Il faut néanmoins noter une faible

baisse de la production de la tomate au cours de la campagne agricole 2009/2010. Cette baisse est due essentiellement à la baisse des rendements due aux attaques provoquées par *Tuta absoluta*, un ravageur redoutable pour les solanacées principalement la tomate (Anonyme 4).

Le rendement de la tomate varie de 120 à 150 T/ha sous serre et de 40 à 60 T/ha en plein champ, selon la qualité de l'entretien alloué à la culture. Dans le cas de culture d'arrière saison arrêtée en Décembre pour être suivie d'une autre culture (haricot vert ou melon), le rendement dépasse rarement 50 à 60 T / ha (Anonyme 1).

Le Maroc a exporté 323135 tonnes de tomate en 2009, avec une part de marché de 5%. Ces exportations de tomate ont connu un rebond de 68% par rapport à l'année 2006. Le Maroc est classé 5ème exportateur mondial de la tomate (Figure I.5). Les tomates destinées à l'exportation proviennent, presque exclusivement (99%) des cultures sous serre, de la région du Souss-Massa Draa. Ces fruits sont expédiés essentiellement (91% des exportations) vers les pays de l'Union Européenne (UE). La France représente le principal marché qui absorbe 86% du volume total des exportations destinées à l'UE (Anonyme 5).

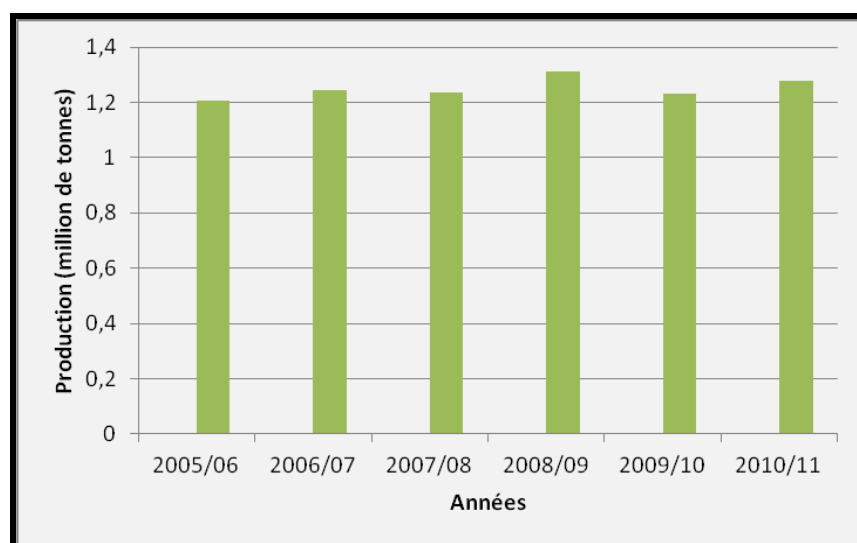


Figure I.6 : Evolution de la production de la tomate au Maroc (Anonyme 2).

Durant la campagne agricole 2009/2010 le Maroc a exporté a peu près 3449 tonnes de la tomate transformée sous différentes formes (concentré, sauces, poudres atomisées, paillettes de tomate...) avec un chiffre d'affaires de 117 millions de dirhams. La France, les Etats-Unis, le Japon, le Royaume-Uni, le Sénégal, et la Russie sont les principaux clients du Maroc pour la tomate en poudre et la tomate surgelée et/ou congelée. Le prix moyen de vente est aux alentours de 34 Dh le kg (Figure I.7).

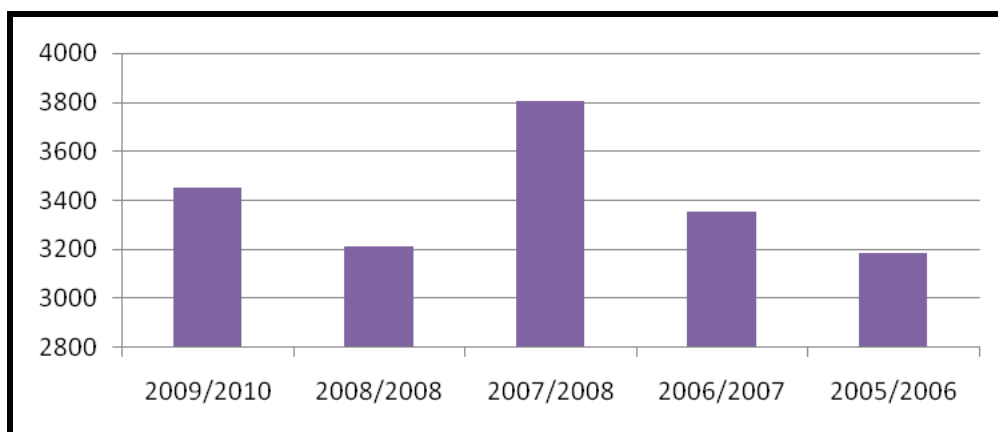


Figure I.7 : Evolution des exportations marocaines en tomate transformée (D'après COMTRADE, cité par Anonyme 3).

Les principales régions de production de la tomate au Maroc sont le Souss-Massa Draa, El Oualidia, El Jadida et Casablanca pour les primeurs et la culture d'arrière saison. La plupart des serres sont situées sur le littoral. La tomate industrielle (destinée à la transformation) est produite dans le périmètre du Loukkos, en premier lieu, et dans différentes régions telles que Saïs, Haouz... (Anonyme, 1).

6.3- A l'échelle régionale

La région du Souss-Massa Draa est la première région au Maroc sur le plan de la production de la tomate primeur sous serre. En effet, cette région a produit environ 58% de la tomate primeur nationale durant la campagne agricole 2010/2011. La production évaluée en 2011/2012 s'élève à 800904 tonnes contre 639671 tonnes en 2009/2010 soit une hausse de presque 25%. Il faut noter aussi que la campagne agricole 2009/2010 s'est marquée par une chute des productions de la tomate aussi bien sous serre qu'en plain champs suite aux aléas climatiques qu'a connus la région durant cette campagne (Figure I.8 A) (Anonyme 5).

Les superficies allouées à la culture de tomate dans la région du Souss-Massa Draa affichent une croissance continue ces cinq dernières années malgré les contraintes rencontrées (allias climatiques, problèmes phytosanitaires, problèmes de commercialisation...etc.). En effet, au cours de cette deuxième moitié de la première décennie du 21^{ième} siècle les superficies de la culture de tomate dans cette région sont passées de 4256 Ha en 2005/2006 à 5608 Ha en 2011/2012. Elles enregistrent donc une hausse de presque 32% en six ans (Figure I.8 B).

Les exportations de la région du Souss-Massa Draa affichent, elles aussi, le même schéma d'évolution pendant les quatre premières années de cette période. Elles passent de 233689 tonnes en 2005/2006 à 404097 tonnes en 2008/2009. Une nette baisse est enregistrée

aussi durant la campagne 2009/2010 s'alliant parfaitement aux problèmes de la production ainsi qu'aux contraintes qu'a connues l'exportation de la tomate vers l'Union Européenne durant cette campagne. Une amélioration des exportations s'est enregistrée durant les deux dernières campagnes agricoles puisqu'elles atteignent 393385 tonnes en 2011/2012 (Figure I.8 C).

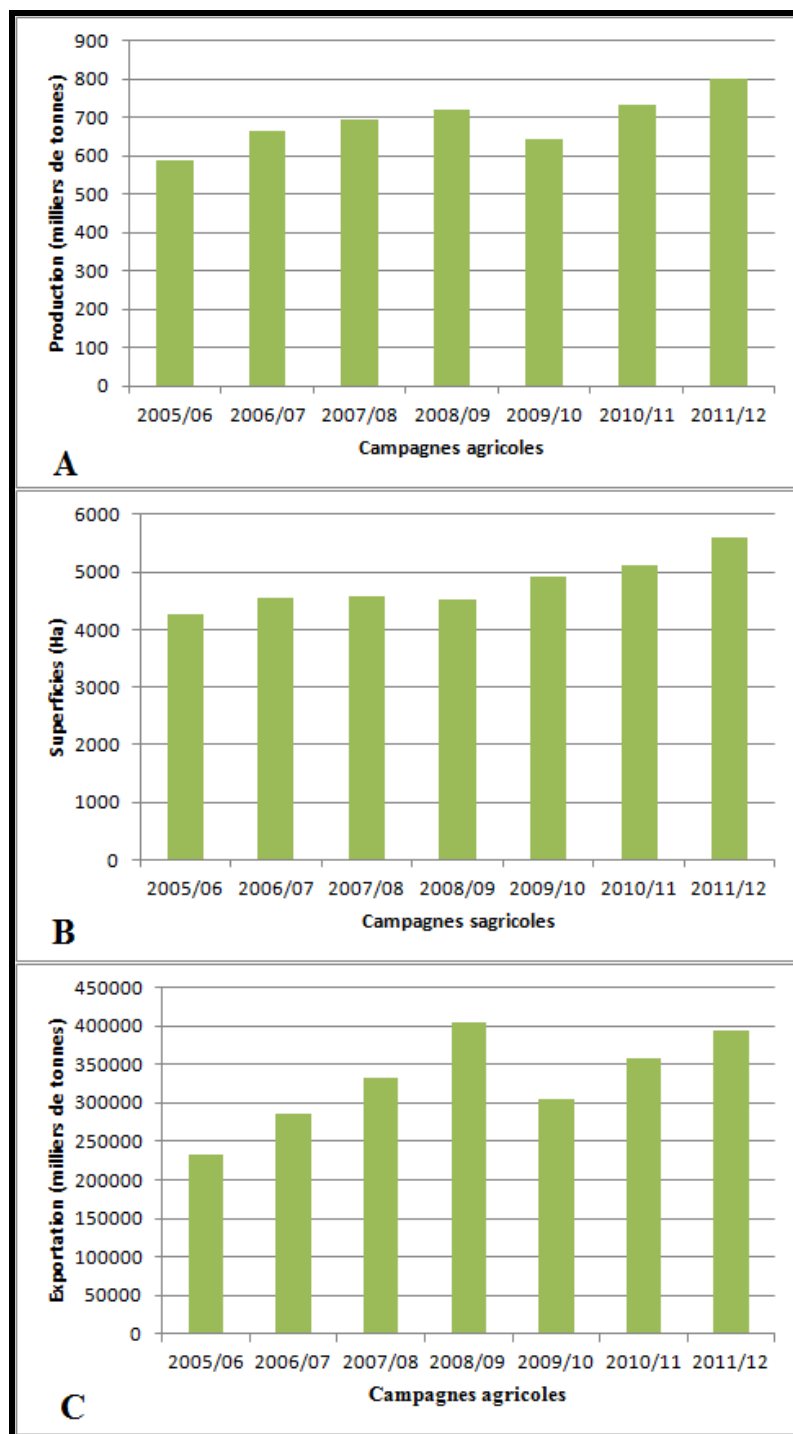


Figure I.8 : Evolution de la production (A), des superficies (B) et des exportations (C) de la tomate primeur dans la région Souss-Massa Draa. (Anonyme 5).

7- Les maladies de la tomate

En dépit de son importance, la culture de la tomate souffre de plusieurs problèmes aussi bien sur le plan agronomique que commercial. De point de vue agronomique, les problèmes phytosanitaires occupent la première place. En effet, environ 200 maladies infectieuses peuvent affecter le fruit de la tomate, elles ont diverses étiologies (Jones *et al.* 1991). Ces pathologies sont principalement dues à des champignons, bactéries et virus. Le tableau I-5 donne quelques exemples de ces pathologies tout en évoquant les agents causals.

Tableau I.5 : les principales maladies de la tomate

Les maladies fongiques	Les maladies bactériennes	Les viroses
L'alternariose: causée par <i>alternaria alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Le chancre bactérien : causé par <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	La mosaïque de la tomate causée par le virus de la mosaïque de la tomate (ToMV) et par d'autres virus non spécifiques qui attaquent la tomate
L'oïdium: causé par <i>leveillula taurica</i>	La moucheture des feuilles : causée par <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	La maladie bronzée de la tomate : Virus de la maladie bronzée de la tomate (TSWV)
La pourriture grise: causée par <i>Botrytis cinerea</i>	La tache bactérienne : causée par <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tomato</i>	Maladie des feuilles jaunes en cuillère de la tomate (Tylc) : Virus des feuilles jaunes en cuillère de la tomate (TYLCV)
Les fusarioses: causées par <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> et <i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>radici-lycopersici</i>	La moucheture bactérienne : causée par <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	La jaunisse apicale de la tomate : Virus de la jaunisse apicale de la tomate
La verticilliose: causée par <i>Verticillium dahlia</i>	Le flétrissement bactérien : causé par <i>Ralstonia solanacearum</i>	
La cladosporiose: causée par <i>Fulvia fulva</i> = <i>Cladosporium fulvum</i>	La moelle noire : causée par <i>Pseudomonas corrugata</i>	
	La pourriture molle bactérienne : causée par <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	

Il faut noter que la culture de la tomate est également soumise à l'action néfaste de plusieurs ravageurs tels que les insectes (mouche blanche, thrips, mineuse...), les nématodes (notamment les nématodes à galles) et les mollusques (surtout la limace grise). Et comme les maladies précitées, ces ravageurs causent aussi des pertes importantes au niveau de cette culture.

II. Le chancre bactérien de la tomate

Cette bactériose a été signalée pour la première fois aux Etats-Unis par Smith en 1909 (Fatmi, 1989). Par la suite la maladie s'est propagée dans les différentes régions productrices de la tomate partout dans le monde (Strider, 1969). Le premier foyer du chancre bactérien en Afrique a été signalé en 1942 dans la région du nord du Maroc (Fatmi, 1989), puis la maladie

n'a cessé de gagner du terrain dans toutes les zones productrices de ce fruit (Fatmi *et al.* 1984). La sévérité de cette affection varie selon les régions de production (Fatmi *et al.* 1984). Pour la région de Souss-Massa, elle est considérée comme un facteur limitant de la productivité de la tomate (Fatmi, 1989).

Le chancre bactérien de la tomate causé par *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.* (1984) est une maladie très contagieuse et destructive de la tomate aussi bien en plein champ que sous serre (Menzies et Jarvis, 1994 ; Utkhede et Koch, 2004). Cette affection peut être considérée comme la plus importante maladie bactérienne pouvant toucher la tomate. Elle provoque en effet des pertes économiques importantes dans le monde entier (Gartemann *et al.* 2003). En réalité, le chancre bactérien de la tomate peut causer la mort prématurée des plants et par conséquent des réductions significatives du rendement. Ces pertes varient d'un pays à l'autre et peuvent atteindre 100% dans les conditions favorables au développement de la bactérie responsable de cette maladie (Chang *et al.* 1992 a).

1-L'agent causal

1.1- Classification

Il s'agit d'une bactérie Gram positif qui fut découverte pour la première fois par E .F. Smith en 1910 et a été nommée *Bacterium michiganense*. En 1934, elle a été renommée *Corynebacterium michiganense* et ce n'est qu'en 1984, que ce pathogène a été classé dans le genre *Clavibacter* ; il devint alors *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* (Davis *et al.* 1984) (Tableau I-6).

Tableau I.6 : Evolution de la nomenclature de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Gleason *et al.* 1993)

Nom	Auteur
<i>Bacterium michiganense</i>	Smith, 1910
<i>Pseudomonas michiganense</i>	Stevens, 1913
<i>Aplanobacter michiganense</i>	Smith, 1914
<i>Phytomonas michiganense</i>	Bergey <i>et al.</i> 1923
<i>Corynebacterium michiganense</i>	Jens, 1934
<i>Corynebacterium michiganense</i> pv. <i>michiganense</i>	Dye et Kemp, 1977
<i>Clavibacter michiganense</i> subsp <i>michiganense</i>	Davis <i>et al.</i> 1984
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i> .	Bergey <i>et al.</i> 1984

Le reclassement a été fait en se basant sur les nouvelles connaissances concernant la composition de sa paroi cellulaire et l'utilisation du séquençage des ADNr 16S. La figure I.9 présente la position phylogénétique de ce pathogène parmi les Microbacteriaceae.

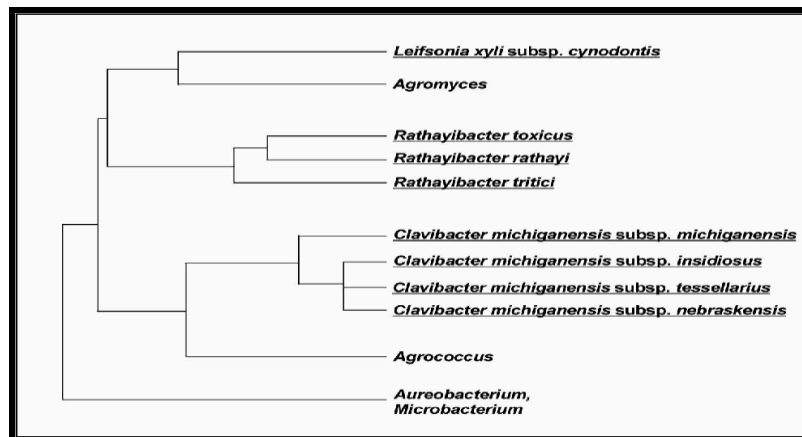


Figure I.9 : L'arbre phylogénique dérivé de la séquence de l'ADNr 16S de certaines espèces de microbacteriaceae. Les bactéries phytopathogènes sont soulignées (Eichenlaub *et al.* 2006).

La position systématique complète de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* est la suivante :

Règne	: Bacteria
Phylum	: Actinobacteria
Classe	: Actinobacteria
Sub-Classe	: Actinobacteridae
Ordre	: Actinomycetales
Sub-Ordre	: Micrococcineae
Famille	: Microbacteriaceae
Genre	: <i>Clavibacter</i>
Espèce	: <i>C. michiganensis</i>
Sous-espèce	: <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>

1.2- Morphologie et mode de vie

C. m. subsp. *michiganensis* est un micro-organisme aérobie, non mobile, Gram positif, non sporulant sous forme de bâtonnet court, droit ou légèrement courbé. Les cellules ne sont pas flagellées et le plus souvent individuelles mais elles peuvent présenter des arrangements en V et/ou en Y lors de la division par scission binaire (Collins et Bradbury, 1986 ; Kirchner, 2003) (Figure I.10).

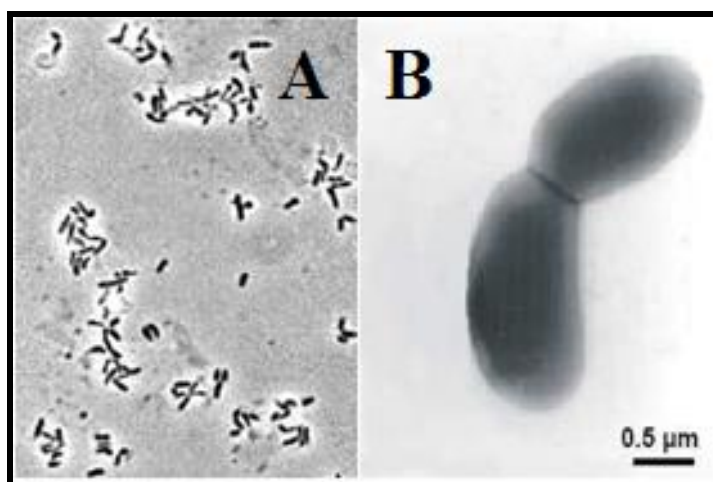


Figure I.10 : Morphologie des cellules de *C. m. subsp. michiganensis*. (Kirchner, 2003).

C. m. subsp. michiganensis est un actinomycète pathogène de la tomate (Gartemann *et al.* 2003). Il se propage à travers le xylème et provoque un flétrissement unilatéral puis général de la plante avec apparition des chancres ouverts aussi bien sur les tiges que sur les pétioles des feuilles. La température optimale de croissance de *C. m. subsp. michiganensis* se situe entre 21 et 26°C. Le pH optimal est compris entre 5 et 7,4. Cette bactérie peut survivre dans et sur les semences, dans les débris de plants de tomate infectés, ainsi que dans le sol et certaines mauvaises herbes (Fatmi, 1989 ; Villeneuve, 2004).

Les données sur la longévité de cette bactérie dans le sol varient en fonction des emplacements géographiques (Strider, 1967 ; Fatmi, 1989) et les différentes méthodes de détection (Fatmi et Schaad, 2002). En effet, Bryan (1930) a récupéré *C. m. subsp. michiganensis* dans du sol, 11 mois après son infection alors que Strider a récupéré cette bactérie à partir du sol inoculé 18 mois après (Fatmi et Schaad, 2002). D'autres auteurs ont rapporté que *C. m. subsp. michiganensis* peut survivre dans le sol au delà de 4 ans ou même persister indéfiniment dans le sol infecté (Ciccarone et Carrilli, 1948 cité par Fatmi et Schaad, 2002).

2-La plante hôte

La tomate est l'hôte principal de *C. m. subsp. michiganensis*. Cependant, il existe d'autres plantes qui peuvent être attaquées par ce pathogène. On compte en effet au moins 13 genres et 35 espèces de Solanacées, y compris le poivron et l'aubergine, ainsi que plusieurs mauvaises herbes appartenant également à la famille des Solanacées (Strider 1969, Thyr *et al.* 1975) qui peuvent constituer des hôtes alternatifs. Cependant pour la plupart de ces espèces

végétales, seule l'inoculation artificielle est efficace. Les symptômes de la maladie sont généralement moins sévères que chez la tomate et dans certains cas, la bactérie peut rester à l'intérieur des tissus de la plante sans causer de symptômes (Thyr *et al.* 1975). Mais elle constitue néanmoins un inoculum initial au niveau des débris qui peut déclencher la maladie une fois les conditions sont favorables.

3-Symptômes du chancre bactérien de la tomate

Le chancre bactérien est caractérisé par un éventail de symptômes qui dépendent des conditions environnementales, du degré de sensibilité de la variété, de l'âge de la plante au moment de l'infection, des pratiques culturales et de la voie d'entrée du pathogène (Gleason *et al.* 1993). Ces symptômes apparaissent sur toutes les parties de la plante (feuilles, tiges et fruits). Ils peuvent résulter soit d'une infection systémique ou localisée (Tableau I.7 et Figures I.11 et I.12).

3.1- Symptômes du chancre bactérien sur les feuilles

Les symptômes initiaux de la maladie apparaissent au niveau des feuilles. Il s'agit en premier lieu d'un flétrissement qui atteint les feuilles des parties inférieures des plants (Utkhede et Koch, 2004). Le flétrissement commence par les folioles situées d'un même côté d'une feuille, on parle donc de flétrissement unilatéral (Figure I.11 B). Ce flétrissement peut s'étendre d'une foliole à l'autre, entraînant un dessèchement rapide de la feuille (Fatmi *et al.* 1991). Au fur et à mesure que la maladie progresse, le flétrissement devient irréversible et généralisé (Figure I.11 A). Il est plus ou moins rapide selon les conditions environnementales (Strider, 1967). Il faut noter aussi l'apparition précoce d'un brunissement des bordures des feuilles (Figure I.12 B) dans le cas de l'infection localisée surtout quand le chancre devient épidémique au champ (Gleason *et al.* 1993 ; Xu, 2010 ; Xu *et al.* 2010 ; De Leon *et al.* 2011).

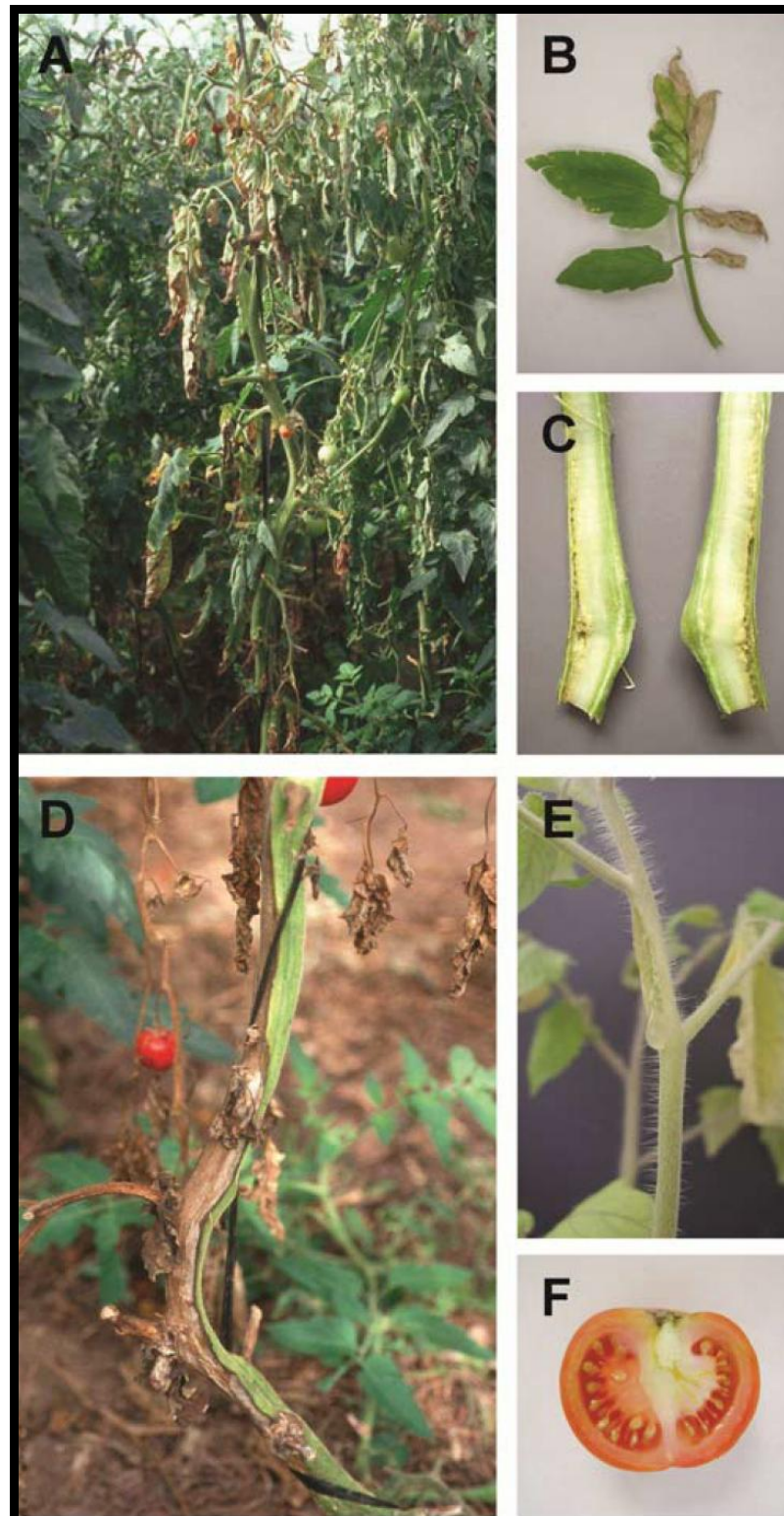


Figure I.11 : Symptômes de l'infection systémique des plants de tomate par *C. m. subsp. michiganensis*. A: Flétrissement généralisé. B: Flétrissement unilatéral des folioles. C : Brunissement d'une partie des tissus vasculaires envahi par le pathogène. D : Chancres au niveau des tiges à des stades avancés de la maladie. E : Des gouttelettes d'exsudat bactérien observées lorsque la tige se fend au début de la formation des chancres. F : le pathogène atteint le fruit et infecte les graines via les tissus vasculaires. (D'après De Leon *et al.* 2011).

Tableau I.7 : Symptômes causé par *C. m. subsp. michiganensis* l'agent causal du chancre bactérien de la tomate (D'après De Leon *et al.* 2011)

Type d'infection	Symptômes	Le Mode d'infection
Systémique	-Flétrissement unilatéral des feuilles et folioles. Il est observé à des stades précoces (Figure I.11 A) -Flétrissement générale de toute la plante (Figure I.11 B) -Brunissement des tissus vasculaires (Figure I.11 C) -Chances sur les tiges et les pétioles (Figure I.11 D)	-Les semences infectées ou infectées transmettent la maladie aux plantules émergentes -Invasion des tissus vasculaires à travers les semences ou les blessures
Localisée	-Taches blanches en blisters au niveau des tiges (Figure I.12A) -Taches en œil d'oiseau sur les fruits (Figure I.12 B) -Nécroses marginales des folioles (Figure I.12 C)	-Infection à travers les trichomes blessés ou les ouvertures naturelles comme les stomates et les hydathodes

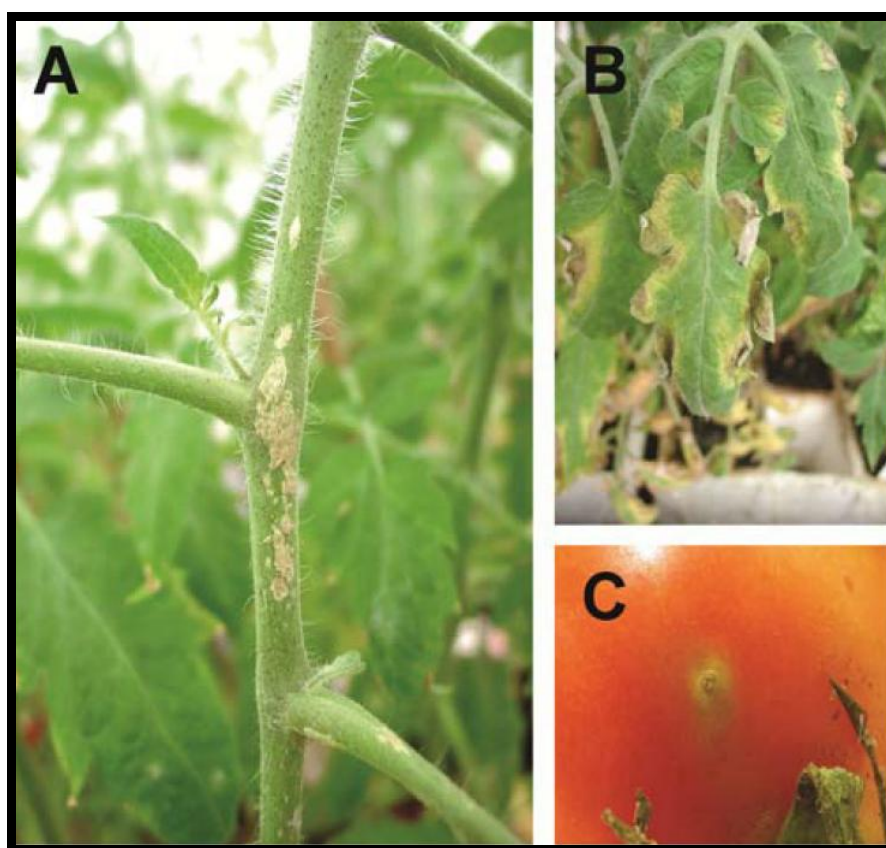


Figure I.12 : Symptômes de l'infection localisée par *C. m. subsp. michiganensis*. A : Petites taches blanches en blisters sur les tiges et les pétioles. B : les nécroses marginales des folioles. C : la tache typique en œil d'oiseau avec l'halo clair qui entoure un centre nécrotique et en relief. (D'après De Leon *et al.* 2011).

3.2- Symptômes du chancre bactérien sur la tige

Au niveau des tiges, des pétioles et des pédoncules floraux, de longues stries brunâtres peuvent apparaître. Ces stries peuvent évoluer en chancre ouvert remplis d'exsudats bactériens en cas de forte chaleur et d'humidité (Figure I.11 D et E). Si l'infection des tiges est localisée, des taches blanchâtres en blisters peuvent apparaître sur les tiges, les pétioles et les pédoncules floraux (Figure I.11 A). Une coupe longitudinale au niveau de la tige montre l'apparition d'une couleur jaune foncée à brune au niveau des tissus vasculaires. En réalité, les tissus sont d'abord jaunes, rouge brunâtres puis brun foncé à noirs selon le stade de l'infection (Gleason *et al.* 1993) (Figure I.11 C). A des étapes plus avancées de l'infection, la présence d'exsudats bactériens jaunâtres est observée au niveau des tissus vasculaires. L'observation microscopique des sections de tiges de plantes infectées laisse voir des cellules bactériennes à l'intérieur des tissus du xylème (Figure I.13).

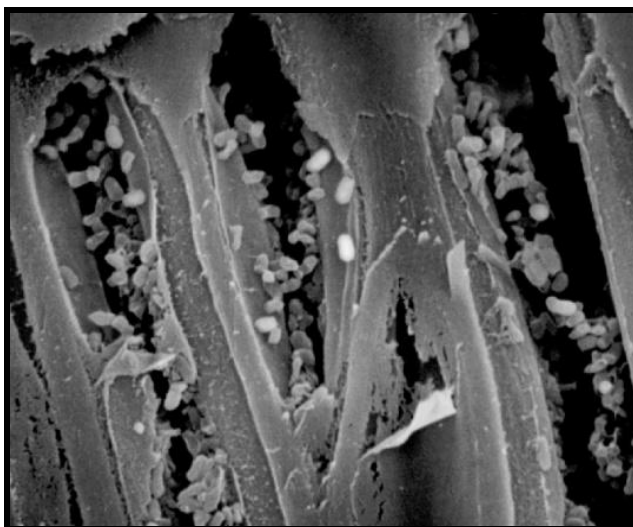


Figure I.13 : Cellules bactériennes observées au niveau des tissus vasculaires d'une tige de tomate infectée (Kirchner, 2003).

3.3- Symptômes du chancre bactérien sur le fruit

Les fruits de la tomate ne restent pas indemnes. En effet, les fruits infectés sont rachitiques et déformés (Utkhede et Koch, 2004). Ils peuvent également ne pas se développer ou mûrir. Ils présentent souvent des marbrures externes et une décoloration des vaisseaux et tissus contigus (Xu *et al.* 2010). Un signe très caractéristique de la maladie apparaît sur les fruits et se traduit par de petites taches blanchâtres de 3 à 6 mm de diamètre, dont le centre légèrement surélevé, est entouré d'un halo jaune clair. Ces taches évoquent la forme d'un œil d'oiseau (Figure I.12 C) (Gitaitis *et al.* 1991 ; Gleason *et al.* 1993 ; Medina-Mora *et al.* 2001 ; Gartemann *et al.* 2003). Ce signe très spécifique de la maladie est souvent décrit comme étant le plus fiable pour la confirmation de la maladie au champ et pour la discrimination entre cette

maladie et d'autres pathologies vasculaires de la tomate (notamment la Fusariose et la Verticilliose). Malheureusement, il n'apparaît que rarement et surtout lorsque la maladie devient épidémique. Les graines issues des fruits infectés sont souvent contaminées (Fatmi *et al.* 1991). En réalité, ces semences contaminées par *C. m. subsp. michiganensis* sont la principale source d'inoculum de ce pathogène en agriculture (Tsiantos, 1987 cité par Gartemann *et al.* 2003).

3.4- Symptômes du chancre bactérien sur les racines

Les racines ne présentent généralement pas de symptômes observables à l'œil nu. Néanmoins, une légère coloration de la moelle peut être observée et présenterait le seul signe d'infection à ce niveau. Parfois, on assiste à l'apparition de racines adventices sur les tiges.

4- Cycle épidémiologique

La principale source connue de la dissémination de la bactérie est la semence. En effet, le commerce international des graines a énormément facilité la dissémination de la maladie à travers le monde (EPPO, 2005). D'autres sources, comme l'eau contaminée par la bactérie et les tempêtes de vent (portant des particules de sol contaminées) sont d'importance mineure. Dès son introduction, la bactérie se propage très facilement d'un plant à l'autre via les stomates des feuilles et des fruits (Strider, 1969 ; Carlton *et al.* 1998 ; Medina-Mora *et al.* 2001), les racines, les blessures et les éclaboussures faites durant le travail. Par ailleurs, la pluie, les traitements phytosanitaires et l'irrigation peuvent faciliter la dissémination de la bactérie et entraîner des attaques généralisées des cultures (Strider, 1969 ; Chang *et al.* 1992 b). La capacité de survie du pathogène dans les champs de production a été confirmée par plusieurs auteurs (Strider *et al.* 1969 ; Fatmi, 1989 ; Gleason *et al.* 1991). Cette survie a lieu au niveau du sol, des débris végétaux et des hôtes alternatifs et constitue le moyen le plus incriminé dans l'apparition de la bactériose, à partir d'anciens foyers, une fois les conditions favorables sont établies. Fatmi (1989) a rapporté que cette bactérie peut survivre de 194 à 314 jours quand les débris sont laissés à la surface du sol et de 60 à 240 jours quand les débris sont enfouis dans le sol. Le cycle de vie de *C. m. subsp michiganensis* est résumé sur la figure I.14.

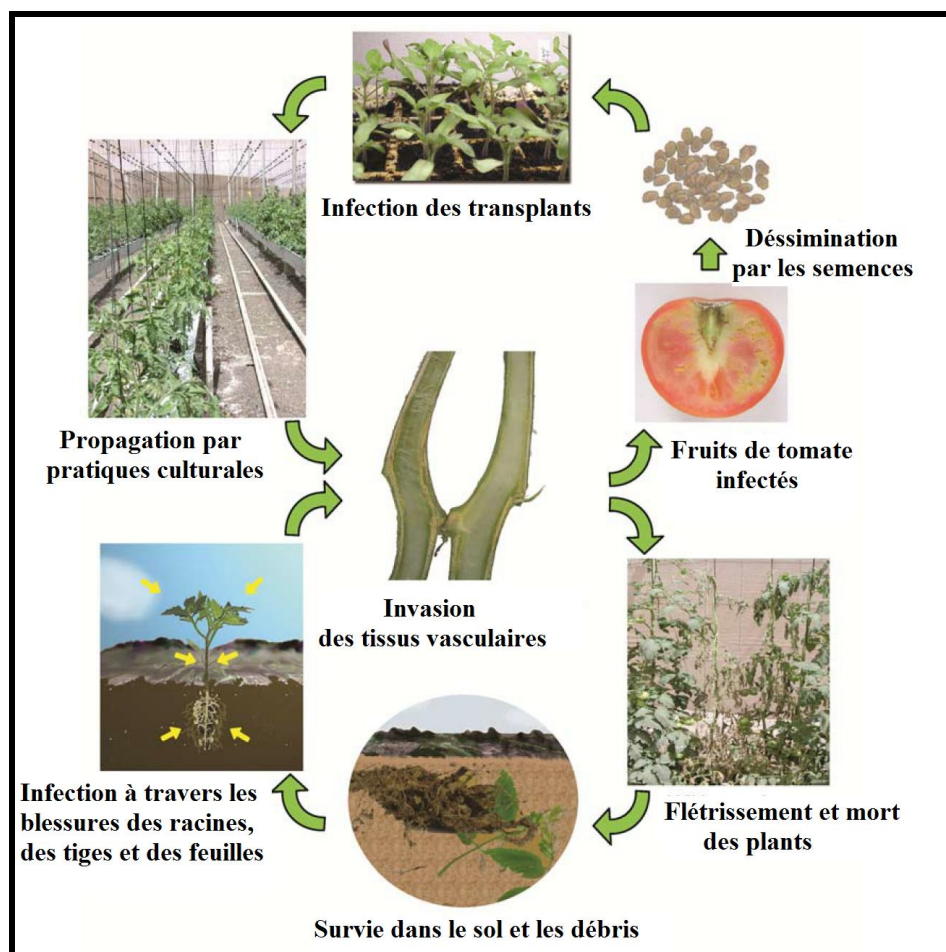


Figure I.14 : Cycle de la maladie du chancre bactérien de la tomate (d'après de León *et al.* 2011 et adapté à partir d'Eichenlaub *et al.* 2006).

En outre, *C. m.* subsp *michiganensis* est un agent pathogène vasculaire qui cause l'infection systémique des plants de tomate (EPPO, 2005 ; Gartemann *et al.* 2008 ; Eichenlaub *et al.* 2006 ; de León *et al.* 2011). Il pénètre dans les vaisseaux du xylème. Cet endoparasite vit et se multiplie principalement à l'intérieur de la plante hôte. C'est seulement à des stades avancés de l'infection que *C. m.* subsp *michiganensis* quitte les vaisseaux du xylème et entre dans les tissus avoisinants après dégradation des parois cellulaires de la plante (Benhamou, 1991 ; Baer et Gudmestad, 1995 ; Eichenlaub *et al.* 2006). Ceci est dû à la production d'enzymes qui dégradent la paroi des cellules végétales (cellulase, polygalacturonase, xylanase) (Beimen *et al.* 1992). Pour expliquer le mécanisme par lequel ce pathogène induit le flétrissement bactérien, plusieurs hypothèses ont été émises. L'handicap physique de transport d'eau causé par la présence des bactéries au niveau des tissus conducteurs peut provoquer un stress hydrique grave entraînant le flétrissement (Gartemann *et al.* 2008). Par ailleurs, la production d'exo polysaccharides (EPS) peut être un facteur contribuant au colmatage des vaisseaux du xylème. Sur le plan génétique, les gènes directement responsables de l'induction

de la maladie chez la plante hôte ont été retrouvés sur des plasmides notamment les plasmides pCM2 et pCM1 qui hébergent respectivement les locus pat-1 (Dreier *et al.* 1997) et celA (Meletzus *et al.* 1993 ; Jahr *et al.* 2000). Ces deux locus codent pour des endoglucanases responsables de la dégradation des tissus du xylème et des cellules du parenchyme adjacent (Gleason *et al.* 1993 ; Meletzus *et al.* 1993 ; Dreier *et al.* 1997 ; Gartemann *et al.* 2008). D'autres enzymes extracellulaires, incluant des pectines méthyle-estérases, des polygalacturonases et des xylanases, sont aussi sécrétés par *C. m.* subsp. *michiganensis*. Ces enzymes sont impliquées dans la dégradation des cellules (Strider *et al.* 1969 ; Beimen *et al.* 1992). Mais les gènes codant pour ces enzymes et régulant leur expression n'ont pas été encore identifiés (Xu *et al.* 2010).

5- Facteurs influençant l'agressivité de la bactérie

L'agressivité de la bactérie et le développement du chancre bactérien de la tomate sont influencés par la température, l'âge de la plante hôte au moment de l'infection, la concentration de l'inoculum et la résistance de la plante (Chang *et al.* 1992 b). En effet, les hautes températures et les concentrations élevées de l'inoculum augmentent de manière significative la sévérité de la maladie ; en particulier au niveau des jeunes plants (Chang *et al.* 1992 a).

6-Méthodes de détection de l'agent pathogène au niveau des semences

La certification rigoureuse des semences et des transplants exige des méthodes de détection très sensibles et fiables. Ces dernières années plusieurs méthodes ont été mises au point.

6.1- Les méthodes standards

Ces méthodes standards reposent sur l'isolement qui est une technique robuste, pas cher et facile à réaliser, elle n'a pas besoin d'équipement spécialisé, et peut isoler les bactéries pathogènes vivantes. Cet isolement se base sur l'utilisation de milieux sélectifs et semi-sélectifs sur lesquels le pathogène se développe différemment avec des aspects de colonies variables selon le milieu considéré. Mais, l'isolement de *C. m.* subsp. *michiganensis* à partir des échantillons de semences et/ou transplants est souvent difficile parce que cette bactérie se développe lentement et les colonies sont fréquemment inhibées par d'autres microorganismes, même avec les milieux semi-sélectifs disponibles. Le tableau I.8 résume les principaux milieux de cultures utilisés pour l'isolement sélectif de *C. m.* subsp. *michiganensis* rapportés dans la littérature.

6.2- Les méthodes sérologiques

Le test le plus souvent utilisé pour la détection sérologique de *C. m. subsp. michiganensis* est encore l'immunofluorescence (IF) à l'aide des anticorps polyclonaux (AcP) disponibles dans le commerce. Plusieurs écrits rapportent que l'IF est couramment utilisé pour l'analyse des semences de tomates de *C. m. subsp. michiganensis* (Alvarez, 2004 ; Gitaitis et Walcott, 2007). Mais on doit noter néanmoins que cette technique donne des résultats positifs à la fois pour des bactéries viables que pour les non viables. L'extraction des semences de tomates par trempage au lieu du simple mélange peut réduire ce problème et c'est la procédure d'extraction recommandée (Franken *et al.* 1993; EPPO, 2005). La limite de détection classique de l'IF est connue pour être d'environ 10^3 cellules ml^{-1} (De León *et al.* 2008 a ; Kokošková *et al.* 2010) (tableau I.8). Les travaux d'Olivier *et al.* (2010) ont abouti à l'amélioration de la limite de détection de l'IF jusqu'à 10^1 à 10^2 cellules ml^{-1} .

Alvarez *et al.* 1993 rapportent que les anticorps monoclonaux (AcM) ont un degré élevé de spécificité contre *C. m. subsp. michiganensis* plus que les AcP. En particulier, l'anticorps monoclonal CMM1 dont la spécificité très élevée l'approche d'être universel. En effet, l'antigène de cet anticorps est présent au niveau des souches géographiquement diversifiées de *C. m. subsp. michiganensis* (Kaneshiro *et al.* 2006). Il est disponible en kits commerciaux d'ELISA. La limite de détection pour le test ELISA correspondant est de 10^4 à 10^5 CFU / ml (De León *et al.* 2008 a ; Franken *et al.* 1993) (Tableau I.8).

Selon Alvarez *et al.* 2005, le dosage immunologique par transfert peut être utilisé pour la détection de *C. m. subsp. michiganensis* au niveau des graines de tomates. Les travaux de Veena et van Vuurde, 2002 évoquent la possibilité de détecter les cellules viables de ce pathogène grâce à l'IFC. La cytométrie en flux a également été appliquée pour la détection de l'agent pathogène dans les extraits de semences (Alvarez et Adams, 1999), elle peut être utilisée en combinaison avec des sondes fluorescentes appropriées pour évaluer le pH intracellulaire des cellules de *C. m. subsp. michiganensis* en tant qu'indicateur de leur viabilité (Chitarra *et al.* 2000).

6.3- Combinaison des méthodes sérologiques et standards

La séparation immuno-magnétique (SIM) qui permet la capture sérologique spécifique des cellules cibles tout en éliminant aussi bien les bactéries non cible que les débris de graines et les composés inhibiteurs, à partir des extraits de semences à analyser. Cette séparation facilite aussi la concentration ultérieure des cellules cibles du pathogène. Pour *C. michiganensis subsp. michiganensis*, la SIM a été appliqué aux extraits de graines avant leur

ensemencement sur un milieu non sélectif (De Léon *et al.* 2006). Cette technique aboutit à des résultats avec une sensibilité meilleure que ceux de l'ensemencement direct sur milieu mSCM, de l'IF ou de la PCR (De Léon *et al.* 2008 a). Le seuil de détection de la SIM est de 1 à 10 UFC / ml d'extrait de semences (Tableau I.8). Cette technique a permis d'isolé l'agent pathogène à partir d'échantillons IF-positifs naturellement infectées pour lesquels les milieux semi-sélectifs et la BioPCR avaient échoué (Olivier *et al.* 2010). Par conséquent, elle peut être une alternative intéressante pour la détection précise, sensible et rapide de *C. michiganensis* subsp *michiganensis* au niveau des semences, permettant ainsi la confirmation de la pathogénicité (De Léon *et al.* 2011).

Tableau I.8 : Sensibilité de l'isolement et de la sérologie pour la détection de *C. m.* subsp. *michiganensis* (d'après De León *et al.* 2011)

Méthode	Milieu de culture/ Anticorps	Sensibilité d'isolement	Références
Isolement	SCM	1 semence contaminée ^b / 10.000 semences	Fatmi et Schaad 1988
	KBTS	1 semence contaminée ^c / 10.000 semences	EPPO 2005
	mSCM; D2ANX; CNS	1 semence contaminée ^d / 5.000 semences	Hadas <i>et al.</i> 2005
	mSCM	10-10 ² UFC / ml de l'extrait des semences	De León <i>et al.</i> 2008 a
	mSCM; D2ANX; mCNS	1 semence contaminée ^e / 5.000 semences	Milijasevic <i>et al.</i> 2009 a
	SCM; D2ANX	1-10 UFC / ml de l'extrait des semences	Olivier <i>et al.</i> 2010
	BCT et BTC2	8 UFC / extrait de plantes ou semences contaminées	Ftayeh <i>et al.</i> 2011
IF^a	AcP de IRP	10 ³ UFC/ml de l'extrait de semences	De León <i>et al.</i> 2008 a
	AcP de IRP	10-10 ² UFC/ml de l'extrait de semences	Olivier <i>et al.</i> 2010
	AcP de Neogen	10 ³ -10 ⁴ UFC/ml culture pure	Franken <i>et al.</i> 1993
IMS/isolement	AcP de IRP/YPGA ^f	1-10 UFC/ml de l'extrait de semences	De León <i>et al.</i> 2008 a
ELISA	AcP obtenus par les auteurs	1 semence contaminée/50 semences	Krämer et Griesbach, 1995

^a Immunofluorescence.

^b Le minimum de contamination est de 50 UFC.

^c Le niveau minimale de contamination est de 8.10² UFC.

^d Le niveau de contamination est de 10²-10³ UFC/semence.

^e Le minimum de contamination est de 10⁸ UFC/semence.

^f YPGA (yeast-peptone-glucose agar).

6.4-Méthodes moléculaires

Ces dernières années et avec le progrès qu'a connu la biologie moléculaire, plusieurs techniques reposant sur la PCR ont été mises à jours pour la détection de *C. m.* subsp. *michiganensis*. Le tableau I.9 résume les principales amorces utilisées en PCR et en RT-PCR comme rapporté par De Léon *et al.* 2011. La première utilisation de la RT-PCR pour la détection de *C. m.* subsp. *michiganensis* est celle décrite par Bach *et al.* 2003. Une différence entre la sensibilité de détection des différentes techniques moléculaire est à noter. Mais La bio-PCR et la RT-PCR sont en générale plus sensibles que la PCR conventionnelle.

Tableau I.9 : Les amorces de la PCR et de la RT-PCR désignées pour la détection de *C. m.* subsp. *michiganensis* (De Léon *et al.* 2011)

PCR	Amorces	Séquences 5'-3'	AND ciblé	Références
Conventionnelle	CMM ₅	GCGAATAAGCCCATATCAA	pat-1 du plasmide pCM2	Dreier <i>et al.</i> 1995
	CMM ₆	CGTCAGGAGGTCGCTAATA		
	PSA-4	TCATTGGTCAATTCTGTCTCCC	ITS 16S-23S	Pastrik <i>et al.</i> 1999
	PSA-R	TACTGAGATGTTTCACTTCCCC		
	CM3	CCTCGTGAGTGCCGGAACGTATCC	L'ADN chromosomique	Santos <i>et al.</i> 1997
	CM4	CCACGGTGGTTGATGCTCGCGAGAT		
	Cmm1-F	GACAAGCACCTCTACACCTGG	la tomatinase de Cmm	Kokošková <i>et al.</i> 2010
	Cmm1-R	TTGATCCCTGACTTCAGCGT		
RT-PCR	FP Cm	TGTCGAGGGCATGTTGCACG	ITS 16S-23S	Bach <i>et al.</i> 2003
	RP Cm	GGAGACAGAATTGACCAATGAT		
	Cmm amorce	TTCCGTCGTCCTGTGTGGATG		
	ITSYG-1	CGCGTCAGGCGTCTGTT	ITS 16S-23S	Zhao <i>et al.</i> 2007
	ITSYG-2	AGTGGACGCGAGCATC		
	Spm4f	TCAGGCGTCTGTTCTGGC	ITS 16S-23S	Luo <i>et al.</i> 2008
	Spm2r	CCCACCACCATCCACAAC		

7-Méthodes d'identification du pathogène avec les tests de pathogénie et de virulence :

Le principe de ces tests repose sur l'inoculation de plantules, de variétés connues pour être sensibles, au stade 2 ou 3 vraies feuilles avec des suspensions du pathogène. En effet, des plantules de variétés connues pour être sensibles ont été inoculées avec des suspensions préparées à partir des colonies présumées être *C. m.* subsp. *michiganensis*. Cette inoculation se fait en général au niveau de la tige entre les cotylédons et la première feuille. L'apparition des symptômes caractéristiques du chancre bactérien (formation des chancres au niveau des sites d'inoculation, jaunissement et nécrose marginales et/ou flétrissement des vraies feuilles) est vérifiée deux à trois semaines après l'inoculation (Anonyme 7). Dans le même contexte Chaldecott et Preece (1983) avaient utilisé le test de dessèchement des cotylédons pour identifier des isolats de *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* (Syn. *C. m.* subsp. *michiganensis*) et de les distinguer des autres bactéries saprophytes Gram négatifs associées à la culture de la tomate. Le test d'hypersensibilité aussi bien sur feuilles de tabac que sur feuilles de mirabilis est largement utilisé pour s'assurer de la virulence de plusieurs pathogènes dont celui du chancre bactérien de la tomate.

8-Méthodes de lutte contre *C. m.* subsp. *michiganensis*

Les mesures classiques de contrôle des maladies bactériennes, telles que l'application des antibiotiques et des bactéricides à base de cuivre, se sont révélées inefficaces dans le cas du chancre bactérien. Par ailleurs, on doit aussi noter l'absence totale de cultivars résistants à cette bactériose (Xu *et al.* 2010). Par conséquent, la méthode la plus appropriée pour limiter l'introduction et la dissémination de *C. m.* subsp. *michiganensis* serait l'utilisation de semences et de transplants de tomate indemnes de pathogènes (Jahr *et al.* 1999). En réalité, *C. m.* subsp. *michiganensis* peut être présent à la surface des semences ou encore sous leurs téguments (Bryan 1930). D'après Bryan (1930), le pourcentage de transmission de la maladie à partir de semences contaminées varie de 1 à 5 %. Cependant, un pourcentage de transmission de l'ordre de 0,01 % est suffisant pour engendrer une épidémie de chancre si les conditions environnementales sont favorables (Chang *et al.* 1991). L'exploration d'autres méthodes de lutte telle que la lutte biologique et/ou intégrée (association de plusieurs méthodes) pourrait constituer une voix prometteuse pour lutter contre cette bactériose. En effet plusieurs auteurs se sont attelés pour explorer cette voie (Boudyach *et al.* 2001 ; Daferera *et al.* 2003 ; Boudyach *et al.* 2004 ; Baysal *et al.* 2005...etc). Les intervenants de ces méthodes de luttent peuvent être soit des microorganismes dits antagoniste et/ou PGPR soit des molécules d'origines biologiques comme les extraits des plantes aromatique et médicinales. Les principaux microorganismes impliqués dans la lutte biologique appartiennent aux genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Trichoderma* ...etc (Bouizgaren, 2013). Et la plupart d'entre eux sont des colonisateurs naturels de la rhizosphère des plantes à protéger (Digat, 1993).

III- Les microorganismes et la lutte biologique

Le contrôle du chancre bactérien de la tomate est un objectif qui reste encore insaisissable à nos jours. La nature sporadique du déclenchement de cette maladie limite l'amélioration de l'efficacité des méthodes de contrôle (Gleason *et al.* 1993). Mais tant que cette maladie est de nature épidémique, le développement des moyens de lutte efficaces s'impose de manière urgente. En réalité, partout dans le monde, la méthode de lutte la plus utilisée contre cette bactériose est l'utilisation de semences certifiées indemnes de *C. m.* subsp. *michiganensis*. Cependant, cette bactériose a été déclarée en 1984 dans l'état de Georgia (USA) en dépit de l'utilisation de transplants certifiés indemnes du pathogène (Gitaitis, 1991). Une récente émergence de cette maladie a été enregistrée en Israël (Kleitman

et al. 2008), au sud de la Turquie (Baysal *et al.* 2011) et en Belgique (Zaluga *et al.* 2013) malgré l'utilisation des semences certifiées.

Ces dernières années, l'exploration et l'introduction des agents de contrôle biologiques (ACB / BCAs en anglais) dans les systèmes de production des cultures dites organiques est en hausse continue (Nicot *et al.* 2011). Ceci va en parallèle avec l'augmentation des articles publiés sur ce sujet, soit 300 publications/ an en 1990 à environ 800 en 2010 (Nicot *et al.* 2011). La recherche et l'isolement de ces ACB est faite généralement à partir de la rhizosphère qui est le lieu d'interaction entre le sol, la plante et les microorganismes. La recherche de ces agents potentiels de contrôle biologique doit cibler les microorganismes qui colonisent cette rhizosphère (Lynch, 1990 ; Standing *et al.* 2008). Plusieurs équipes de recherche se sont intéressé à ce sujet et ont pu isoler, évaluer l'efficacité *in vitro* et *in vivo*, déterminer les mécanismes d'action et caractériser une multitudes d'agents de contrôle biologiques appartenant principalement aux genres ; *Pseudomonas* et *Bacillus* (Ramesh *et al.* 2009 ; Elbanna *et al.* 2010 ; Fallahzadeh-Mamaghani *et al.* 2009, Devi *et al.* 2011, Pastor *et al.* 2010 et 2012 ; Kyselková et Moëne-Loccoz, 2012 ...etc).

1- Les *Pseudomonas* spp. fluorescents et la lutte biologique

La capacité des *Pseudomonas* spp. fluorescents à coloniser rapidement la rhizosphère fait de ces bactéries un groupe taxonomique de grand intérêt pour leur utilisation en lutte biologique (Verma *et al.* 2007 ; Trivedi *et al.* 2008). Andreote *et al.* (2009) ont prouvé l'efficacité de *Pseudomonas putida* strain P9 dans la suppression de *Phytophthora infestans* agent pathogène de la pomme de terre. Ils ont obtenu une diminution des lésions de l'ordre de 45% après cinq jours de l'infection par *Phytophthora infestans*. L'importance de la suppression dépend du cultivar utilisé et semble être associée à une modification des communautés bactériennes associées aux racines de cette plante. Mercado-Blanco *et al.* (2004) ont pu isoler des bactéries appartenant aux espèces *P. fluorescens* et *P. putida* à partir des sols entourant les racines des oliviers. Ces bactéries ont été utilisées pour contrôler le champignon *Verticillium dahliae*. Les résultats de trois expériences ont indiqué que le traitement des racines avec certains des isolats de *P. fluorescens* a considérablement retardé l'apparition des symptômes (31 à 82%), et a réduit l'incidence de la maladie et sa sévérité finale (73 à 96%) respectivement, par rapport au témoin non traité, et ce sous conditions de sévère verticilliose (Mercado-Blanco *et al.* 2004). Le tableau I.10 donne des exemples d'agents de contrôle biologiques à base de *Pseudomonas* spp. fluorescents aussi bien contre

l'agent du chancre bactérien qu'envers d'autres agents phytopathogènes. Le tableau I.11 illustre les principaux bio-pesticides commercialisés à base de *Pseudomonas* spp. fluorescens. Ce dernier est réalisé selon la liste des produits commerciaux formulés pour le contrôle biologique des pathogènes des plantes parue en 2004 ainsi qu'à partir de l'écrit de Cawoy *et al.* (2011). Quelques produits sont extraits de la revue de Lugtenberg et Kamilova (2004) cité par Validov 2007.

Tableau I.10 : Quelques exemples récents d'agents de contrôle biologiques à base de *Pseudomonas* spp. fluorescents (depuis 2004)

Agent de contrôle	Plante	Pathogènes à contrôler	Références
<i>P. fluorescens</i> PSR21	Tomate	<i>C. m. subsp. michiganensis</i>	Ślusarski (2004)
<i>P. fluorescens</i>	Olivier	<i>Verticillium dahliae</i>	Mercado-Blanco <i>et al.</i> (2004)
<i>P. putida</i>	Olivier	<i>Verticillium dahliae</i>	Mercado-Blanco <i>et al.</i> (2004)
<i>P. fluorescens</i> Q8rl-96	Blé	Plusieurs champignons	Huang <i>et al.</i> (2004)
<i>P. putida</i> HF142	Tomate	<i>C. m. subsp. michiganensis</i>	Boudyach <i>et al.</i> (2004)
<i>P. fluorescens</i> HF22	Tomate	<i>C. m. subsp. michiganensis</i>	Boudyach <i>et al.</i> (2004)
<i>P. fluorescens</i> PGPR1-9	Cacahuète	Plusieurs champignons	Dey <i>et al.</i> (2004)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Cajanus cajan	Plusieurs pathogènes	Siddiqui <i>et al.</i> (2005)
<i>P. aeruginosa</i> PUPa3	Plusieurs plantes	Plusieurs champignons	Kumar <i>et al.</i> (2005)
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Plusieurs plantes	Divers phytopathogènes	Cirvilleri <i>et al.</i> (2005)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Plusieurs plantes	Divers champignons	Verma <i>et al.</i> (2007)
<i>P. CMR5c</i>	Le macabo	<i>Pythium myrotylum</i>	Perneel <i>et al.</i> (2007)
<i>P. CMR12a</i>	Le macabo	<i>Pythium myrotylum</i>	Perneel <i>et al.</i> (2007)
<i>P. corrugata</i>	Diverses plantes	<i>F. oxysporum</i> et <i>A. alternaria</i>	Trivedi <i>et al.</i> (2008)
<i>P. aeruginosa</i> CMG1055	Divers plantes	Divers champignons	Uzair <i>et al.</i> (2008)
<i>P. chlororaphis</i> PCL1391	Haricot vert	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Bardas <i>et al.</i> (2009)
<i>P. fluorescens</i> WCS365	Haricot vert	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Bardas <i>et al.</i> (2009)
<i>P. putida</i> PCL1760	Tomate	<i>Fusarium oxysporum</i>	Validov <i>et al.</i> (2009)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Canne à sucre	<i>Colletotrichum falcatum</i>	Mehnaz <i>et al.</i> (2009)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Cotton	<i>Xanthomonas compestris</i>	Fallahzadeh <i>et al.</i> (2009)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Aubergine	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Ramesh <i>et al.</i> 2009
<i>P. putida</i> strain P9	Pomme de terre	<i>Phytophthora infestans</i>	Andreote <i>et al.</i> (2009)
<i>P. fluorescens</i>	Tomate	<i>C. m. subsp. michiganensis</i>	Xu <i>et al.</i> (2010)
<i>P. fluorescens</i>	Riz	<i>Rhizoctonia solani</i>	Anitha et Arun-Das (2011)
<i>P. fluorescens</i> PCI2	Tomate	Plusieurs champignons	Pastor <i>et al.</i> (2010 et 2011)
<i>P. fluorescens</i>	Concombre	<i>Phytophthora drechsleri</i>	Maleki <i>et al.</i> (2011)
<i>Pseudomonas</i> RFP 36	Fève	<i>R. solani</i> et <i>M. phaseolina</i>	Devi <i>et al.</i> 2011
<i>P. protegens</i> CHAO	Plusieurs plantes	Divers pathogènes	Ramette <i>et al.</i> (2011)

Tableau I.11 : Exemples de bio-pesticides commercialisés, formulés à base de *Pseudomonas* spp. fluorescents agent de contrôle biologiques des pathogènes des plantes.

Nom	Antagoniste	Hôte	Pathogènes	Société	Pays
Bioject Spot-Less	<i>P. aureofaciens</i>	Les Truffes	<i>Colletotrichum graminicola</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> et <i>Sclerotinia homeocarpa</i>	Turf Science Laboratories, USA	USA
Bio-save 10LP/110	<i>P. syringae</i>	Pomme de terre et quelques arbres fruitiers	Divers pathogènes en culture et en post récolte	Jet Harvest Solutions, USA	USA
BlightBan	<i>P. fluorescens</i> A506	Tomate, pomme de terre et arbres fruitiers	Erwinia amylovora et d'autres pathogènes	NuFarm Inc.	-
Cedomon	<i>P. chlororaphis</i>	Orge et avoine	Maladies liées aux semences	Lantmännen BioAgri AB, Suède	Italie, Finlande, suède, Danemark et Pologne
Cerall	<i>P. chlororaphis</i>	Blé, seigle et triticales	Tilletia caries, <i>Septoria nodorum</i> et <i>Fusarium</i> sp.	Lantmännen BioAgri AB, Suède	Suède, Finlande, Suisse, Autriche et Lituanie
Victus ^a	<i>P. fluorescens</i>	Champignons	<i>Pseudomonas tolaassii</i>	-	-
Ateze ^a	<i>P. chlororaphis</i> 6328	Pois, concombre et plantes ornementales	<i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Cylindrocladium</i> et <i>Fusarium</i>	-	-
PSSOL ^a	<i>P. solanacearum</i> non pathogène	Plusieurs végétaux	<i>P. solanacearum</i> pathogène	-	-

^a Lugtenberg et Kamilova (2004) cité par Validov 2009

2- La colonisation une étape clé dans la sélection des antagonistes

Le facteur déterminant de la réussite du contrôle biologique est l'aptitude des antagonistes à coloniser le système racinaire des plantes en présence de la microflore indigène. Un agent potentiel de lutte biologique doit en effet se maintenir et se multiplier le long de la racine, il doit donc avoir une grande compétence rhizosphérique c'est à dire une grande aptitude à la colonisation. Cette aptitude à la colonisation dépend du pouvoir compétitif de la bactérie introduite vis-à-vis des rhizobactéries indigènes (Suslow, 1982) et de son pouvoir de se maintenir le long du système racinaire de la plante hôte (Bahme et Schroth, 1987). Bahme et Schroth (1987) tout en étudiant la colonisation de la rhizosphère de la pomme de terre par une souche de *Pseudomonas fluorescens* ont montré que le nombre des bactéries diminue avec la profondeur, il suit une évolution log-normale aussi bien verticalement qu'horizontalement.

La colonisation constitue une étape clé dans l'expression de l'effet bénéfique des antagonistes introduits artificiellement dans le système plante-sol. Elle est régie par de nombreux facteurs relatifs aux souches bactériennes et aux conditions biotiques et abiotiques de l'environnement de la plante (racines de la plante). Le pouvoir colonisateur de l'agent de biocontrôle dépend en effet de la nature des exsudats racinaires, de la température, du pH, de la texture du sol ainsi que de la nature même de cet agent (Milus et Rothrock, 1991 ; Millus *et al.* 1993). Ces mêmes auteurs ont montré que les meilleures souches colonisatrices des racines du blé sont des *Pseudomonas fluorescens* et des *Xanthomonas maltophilia* et qu'il y'a une forte corrélation entre la densité initiale de la population microbienne sur les semences et la population qui subsiste dans la rhizosphère. L'apport des antagonistes dans le système plante-sol peut s'effectuer de trois manières différentes selon les auteurs :

- ◆ Soit directement dans le sol par simple aspersion avec une suspension bactérienne de concentration connue (Digat *et al.* 1988).
- ◆ Soit au niveau des racines par trempage de celles-ci dans une suspension bactérienne (Digat *et al.* 1988). Cette méthode est souvent utilisée conjointement avec la première.
- ◆ Soit au niveau des semences par leur bactérisation (Suslow, 1982 ; Digat, 1992). Le traitement des semences, qui porte le nom de bactérisation, reste la méthode la plus prometteuse et la plus utilisée pour l'introduction des agents antagonistes dans l'écosystème sol-plante.

2.1-Bactérisation des semences

L'amélioration de la croissance et la protection des plantes par la bactérisation des semences est de plus en plus étudiée. Il s'est avéré que la flore microbienne des semences influence souvent les différentes phases de la germination, l'expression du potentiel génétique de la semence elle-même ainsi que la qualité et la quantité du peuplement microbien de la spermosphère (Digat, 1992). En effet, dès le semis, et avant qu'elles ne germent, les semences peuvent être colonisées par de nombreux microorganismes qui exercent sur elles une pression par épuisement de nutriments accompagnée d'effets néfastes (Digat, 1992 ; Suslow, 1982). Il serait donc bénéfique d'introduire sur la semence une population de bactéries connues pour ses effets bénéfiques sur la plante. L'installation précoce de ces agents biologiques favorisera la colonisation de la spermosphère et de la rhizosphère et pourra empêcher l'agression de la semence par certaines bactéries et champignons pathogènes (Digat, 1989).

2.1.1-Techniques de bactérisation des semences

Quatre techniques de bactérisation des semences peuvent être appliquées : le trempage, le pelliculage, l'enrobage et l'encapsulation (Digat, 1989 ; Digat, 1992). Le principe de base de ces différentes méthodes est de parvenir à immobiliser temporairement les bactéries sur les semences, tout en conservant un taux convenable de survie bactérienne et de germination de la graine. Le trempage est de loin la technique la plus simple à utiliser. La graine, désinfectée par trempage dans l'hypochlorite ou l'alcool, est plongée dans une suspension bactérienne de concentration connue (Digat, 1989). Cependant, dans la pratique, les protocoles expérimentaux varient d'un auteur à l'autre, que ce soit au niveau de la concentration de la suspension bactérienne ou de la durée du trempage. Ainsi, Bashan *et al.* (1995) trempent les semences de blé pendant 5mn dans une suspension bactérienne ensuite elles les soumettent à un vide partiel (600 mmHg). Lorsque la pression normale est établie, les bactéries pénètrent dans les cavités des téguments de la graine d'où l'eau a été expulsée.

Suslow et Schroth (1982) rapportent que le trempage n'est pas satisfaisant du fait que le séchage des semences entraîne un taux élevé de mortalité des *Pseudomonas spp.* introduites. Ils ont donc développé une autre technique dite le pelliculage et l'ont appliquée aux semences de la betterave sucrière à l'aide de diverses substances telle que la gomme arabique et la carboxyméthylcellulose. Ce dernier composé adhésif est très utilisé à différentes concentrations (de 1 à 2%) (Chao *et al.* 1986; Pierson et Weller, 1994 ; Raupach et Kloepper, 1998). La concentration des bactéries antagonistes dans la suspension utilisée varie de 10^8 à 10^9 UFC/graine.

Kloepper et Schroth (1981) ont également utilisé divers adhésifs mais cette fois-ci associés à du talc pour enrober les tubercules de pomme de terre ; 5ml d'une solution de l'adhésif (concentration $< 1\%$) sont mixés pendant 20mn avec 5ml d'une suspension bactérienne de concentration connue, du talc est ensuite ajouté. Le mélange ainsi préparé est séché pendant 3 à 4 jours à 12°C . Les tubercules de pomme de terre sont enrobés, avant d'être plantés, par la poudre obtenue après séchage. La concentration finale des bactéries dans la poudre varie en fonction du type et de la concentration de l'adhésif utilisé. D'autres auteurs utilisent l'aliginate 2% et une solution de CaCl_2 (0,1M) pour l'enrobage des semences du blé (Bashan *et al.* 1986).

La dernière technique est l'encapsulation, elle est peu utilisée. Elle consiste en l'enrobage des graines par une couche de bactéries mélangées à un substrat nutritif et enveloppées par un polymère (alginate de Ca) mélangé à une argile (le Kaolin) (Digat, 1992). Cette méthode de bactérisation a été appliquée aux semences de plusieurs plantes telles que : le soja, la tomate, le pois, la betterave à sucre et la laitue.

2.1.2-Avantages et limites de la bactérisation

La colonisation de la spermosphère est le facteur principal déterminant de la colonisation racinaire, d'où l'intérêt indéniable de la bactérisation des semences (Digat, 1989). L'enrobage et l'encapsulation permettent d'obtenir des semences calibrées ce qui facilite le semis de précision (Digat *et al.* 1992). Par ailleurs, le problème majeur de la bactérisation est d'assurer la viabilité des bactéries. En effet, certaines souches de *P. fluorescens* ne survivent pas au séchage des graines (Suslow et Schroth, 1982). L'enrobage et l'encapsulation apportent une solution à ce problème ; Ils évitent le dessèchement des bactéries en leur apportant un substrat nutritif (Digat *et al.* 1992). Cependant, l'utilisation de substrat nutritif constitue en lui-même une limite dans la mesure où ce milieu peut être colonisé par d'autres micro-organismes pouvant entraîner une baisse de la viabilité des agents de contrôle (les antagonistes). Le dernier problème qui se pose lors de la bactérisation concerne la germination des semences bactérisées. En effet, les substances employées pour pelliculer, enrober ou encapsuler les semences peuvent être toxiques ou gêner la respiration des semences, ce qui influencera le pouvoir germinatif de celles-ci (Digat *et al.* 1992).

2.2-Méthodes de détection des antagonistes introduits dans la rhizosphère

La détection des bactéries introduites dans la rhizosphère nécessite le développement de moyens précis pour les différencier des micro-organismes indigènes.

2.2.1-Techniques immunologiques

L'utilisation des techniques immunologiques en écologie microbienne n'est pas récente mais elle reste encore très employée. En effet, lorsque des anticorps spécifiques de la souche à étudier sont disponibles, ces techniques permettent la visualisation in-situ et la quantification de la population même si la souche étudiée n'est pas cultivable. Mais, l'inconvénient de ces techniques est la surestimation des populations microbiennes puisque les bactéries mortes peuvent être reconnues par les anticorps (Kluepfel, 1993 cité par Susse, 1998). La spécificité et le seuil de détection de ces techniques sont liés à la nature et à l'origine des anticorps utilisés. Ainsi le recours aux anticorps monoclonaux permet d'augmenter la spécificité et le seuil de détection.

2.2.2-Techniques utilisant des gènes marqueurs

a-Mutants spontanés résistants aux antibiotiques

Cette méthode de détection est la plus ancienne. Cependant, elle est couramment utilisée à nos jours. Les mutants résistants sont sélectionnés en faisant pousser la souche sauvage étudiée sur un milieu de culture additionné d'un ou de plusieurs antibiotiques de marquage (Bahme et Schroth, 1987). La résistance à la Rifampicine est fréquemment utilisée. Cette résistance est connue pour être stable et rare chez les micro-organismes telluriques ; c'est une mutation portée sur l'ADN génomique alors que la résistance aux autres antibiotiques est généralement portée sur l'ADN plasmidique facilement transférable d'un micro-organisme à un autre (Raupach et Kloepper, 1998). Chao *et al.* (1986) ont utilisé des mutants résistants à la Rifampicine pour suivre la colonisation des racines de *Pisium sativum* par des agents de biocontrôle. De manière similaire, Moenne-loccoz *et al.* (1998) ont obtenu un mutant résistant à la Rifampicine de la souche PF113 de *Pseudomonas fluorescens* facile à suivre dans la rhizosphère de la betterave à sucre. D'autres chercheurs ont eu recours aux mutants doubles résistants à la Rifampicine et à l'acide nalidixique (Weller, 1984 cité par Susse, 1998). Des études plus récentes ont utilisé la résistance à plusieurs antibiotiques comme outils de marquage dans le but d'augmenter la sélectivité du ré-isollement des bactéries marquées. Ainsi Boudyach (2004) a employé une combinaison de quatre

antibiotiques et d'un antifongique pour le marquage des bactéries antagonistes avant leur application dans les essais de contrôle biologique du chancre bactérien de la tomate.

b-Souches génétiquement modifiées

Etant donné le développement des techniques de biologie moléculaire ces dernières années, une nouvelle méthode de détection phénotypique a vu le jour comme une alternative à l'utilisation des mutants spontanés résistants à un ou plusieurs antibiotiques, c'est l'utilisation de souches génétiquement modifiées (Prosser, 1994 cité par Susse, 1998). Le marquage génétique consiste à introduire une séquence d'ADN dans le génome de la souche étudiée de façon à faciliter son identification par l'expression du gène marqueur. Les gènes marqueurs les plus utilisés sont les gènes de résistance à des antibiotiques ou des gènes codant pour des activités cataboliques exogènes. L'addition d'un substrat chromogénique approprié dans le milieu déclenche une coloration qui permet la détection qualitative et quantitative de la souche marquée. Cette technique se heurte à une réglementation stricte qui contrôle et limite la dissémination des organismes génétiquement modifiés dans l'environnement en raison des risques imprévisibles que peuvent avoir ces modifications sur la santé du consommateur comme sur son environnement immédiat à moyen et à long terme (Moenne-Loccoz *et al.* 1998).

3- Les mécanismes d'action des PGPR agents de contrôle biologique

Les bactéries antagonistes aux pathogènes des plantes peuvent exercer leur effet par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes qui peuvent être directs ou indirects (Suslow, 1982 ; Kloepper *et al.* 1991 et Digat, 1992). L'isolement de ces antagonistes se fait sur la base de leur antibiose *in-vitro* envers les pathogènes et/ou sur la base de leur pouvoir stimulateur de la croissance et de la vigueur des plantes.

3.1-Action directe

Kloepper *et al.* (1980) ont été les premiers à mettre en évidence l'effet direct d'une souche de *Pseudomonas fluorescens* sur la croissance de certains pathogènes. Cette action directe se fait, en présence de l'agent pathogène. Elle conduit à une modification des équilibres microbiens dans la rhizosphère à l'encontre des pathogènes. Les mécanismes mis en jeu sont :

- ◆ L'antibiose par la production d'antibiotiques et de molécules toxiques (la pyrrolnitrine, la pyolutéorine, l'acide cyanhydrique, DAPG...)

- ♦ La compétition pour l'espace et les éléments nutritifs (le fer et les composés carbonés).

3.1.1-L'antibiose

La production des antibiotiques par les "PGPR" antagonistes a été mise en évidence dans un premier temps *in-vitro*. Plusieurs auteurs ont pu isoler, purifier et identifier plusieurs molécules antibiotiques (Tableau I-12). Howell et Stipanovic (1980) ont mis en évidence la synthèse de deux antibiotiques, la Pyrrolnitrine et la pyolutéorine, par la souche Pf5 de *P. fluorescens*. Ces antibiotiques inhibent *in-vitro* la croissance de *Pythium ultimum* (agent causal de la fonte des semis et de la pourriture du collet des plantes) et de *rhizoctonia solani* (agent de la fonte des semis et de la pourriture des racines des plantes). Ces mêmes auteurs ont rapporté que ces antibiotiques purifiés protègent les plantes du coton de manière analogue à celle obtenue par la souche Pf5 elle-même. Des études très récentes rapportent que ces deux antibiotiques sont le support de l'activité biologique de plusieurs souches de *Pseudomonas* fluorescents envers une multitudes d'agents pathogènes (Ligon *et al.* 2000; Ramette *et al.* 2011 ; Rosas *et al.* 2011...etc) (Tableau I-12).

Plusieurs travaux ont succédé et ont mis en évidence la production d'autres substances antibiotiques qui entrent dans le contrôle biologique des pathogènes des plantes. Ainsi, Thomashow et Weller (1988) indiquent que le mutant Tn5 de la souche 2-79 de *P. fluorescens*, incapable de produire des quantités détectables de l'antibiotique phénazine-1-carboxylique (PCA), perd sa capacité d'inhiber la croissance de *G. graminis var.tritici in-vitro* ainsi que sa capacité de contrôler la fonte des semis du blé. Ces résultats suggèrent fortement que l'action de cette souche est due principalement à l'acide Phénazine-1-carboxylique. Ramette et ces collaborateurs (2011) évoquent aussi que *Pseudomonas protegens* produit le 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG) un antibiotique à vertu antifongique impliqué dans le contrôle biologique de plusieurs pathogènes.

Raaijmakers et Mazzola (2012) rapportent que l'environnement du sol et des plantes associées abritent de nombreuses bactéries qui produisent des métabolites antibiotiques avec des activités spécifiques ou à large spectre contre les microorganismes qui coexistent. La fonction et l'importance écologique des antibiotiques ont longtemps été pris en considération pour donner un avantage de survie aux bactéries les produisant dans des environnements de sols très compétitifs, mais où les ressources sont limitées et ce par ce qu'on appelle la suppression directe. De nombreux processus modulés par les antibiotiques peuvent être intrinsèquement critique à la bactérie les produisant, comme l'acquisition de substrats ou

initiation de changements développementaux qui assureront la survie dans des conditions de stress. Les antibiotiques peuvent également avoir un rôle dans des interactions plus complexes, y compris la virulence sur les plantes hôtes. Les fonctions innées des antibiotiques aux bactéries produisant dans leur écosystème indigène commencent tout juste à émerger, mais les connaissances actuelles révèlent déjà une largeur d'activités bien au-delà de la perspective historique des antibiotiques comme armes dans les conflits microbiennes (Raaijmakers et Mazzola, 2012).

Tableau I-12 : Principales molécules toxiques synthétisées par certaines souches de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*.

Les molécules	Les auteurs
Pyrrolnitrine	Howell et Stipanovic (1979), Ligon <i>et al.</i> (2000)
Pyolutéorine	Ramette <i>et al.</i> 2011 Howell et Stipanovic (1979) Keel <i>et al.</i> (1992)
Phénazines	Weller (1983), Raio <i>et al.</i> (2011) Thomashow et Weller (1988), Pierson et Thomashow (1992) Chin-A-Woeng <i>et al.</i> (1998)
Oomycine A	Howie <i>et al.</i> (1988), Howie et Suslow 1986 Gutterson <i>et al.</i> (1986)
2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG)	Zhou <i>et al.</i> (2012) Ramette <i>et al.</i> (2011) Haas D, Defago G. (2005) Raaijmakers et Weller (2001) Keel <i>et al.</i> (1992) Vincent <i>et al.</i> (1991) Howell et Stipanovic (1979)
Sulfure d'hydrogène	Loper et Schroth (1986), Loper (1988)
Ethylène	Keel <i>et al.</i> (1992)
Acide cyanhydrique (HCN)	Michelsen et Stougaard (2012). Benizri <i>et al.</i> (1995) Digat (1993)
Viscosinamide	Nielsen <i>et al.</i> (1999)
2-heptyl-5-hexylfuran-3-carboxylic acid (HHCA)	Wang <i>et al.</i> (2011)
Butyrolactones	Gamard <i>et al.</i> (1997)
Furanone	Paulitz <i>et al.</i> (2000)

3.1.2-La compétition

Le premier type d'interaction mis en jeu entre les micro-organismes est le phénomène de compétition aussi bien pour l'espace que pour les éléments nutritifs. La compétition trophique s'exerce essentiellement pour les exsudats racinaires et pour le fer. En effet, ce dernier élément bien qu'abondant dans le sol, s'y trouve essentiellement sous forme oxydée (Fe^{3+}) non assimilable par les micro-organismes telluriques. Certains ont développé des stratégies d'acquisition (d'assimilation) du fer en synthétisant des sidérophores (molécules chélatrices du fer) et des protéines membranaires réceptrices du complexe sidérophore/fer à leur surface. Kloepper *et al.* (1980) ont été les premiers à prouver la synthèse d'un sidérophore (Pseudobactin) par une souche de *P. putida*. Ces auteurs ont pu démontrer la corrélation entre la synthèse de cette molécule et le potentiel antagoniste de cette souche contre les pathogènes; ceci grâce à l'utilisation de souches mutantes dont le gène responsable de la synthèse de Pseudobactin a été supprimé. De manière similaire, Becker et Cook (1988) ont montré que 5 souches de *Pseudomonas* fluorescents déficientes pour la synthèse des sidérophores, suite à une mutation par le N méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, deviennent incapables d'inhiber la croissance de *Pythium ultimum*. L'importance de cette compétition vis-à-vis du fer a été confirmée par Weller *et al.* (1988) qui ont montré que la suppression de la pourriture des racines du blé, causée par *G. graminis var. tritici*., par les *Pseudomonas* spp. fluorescents est due à la production de sidérophores. Cette production dépend de la concentration du fer dans le milieu de culture. Ce résultat a été corroboré par l'équipe de DeWeger (1988) qui a montré que la production du Pseudobactin 358 par la souche WC358 de *P. putida* est très influencée par la disponibilité du Fer dans le sol. L'ensemble de ces résultats confirme une fois de plus que la capacité de ces souches à inhiber la croissance du pathogène est directement liée à leur pouvoir de produire des sidérophores dans des conditions de faible pH.

La compétition pour les substrats carbonés des exsudats racinaires permet aux PGPR antagonistes de réduire les populations d'agents pathogènes au niveau des zones à forte exsudation (Lemanceau, 1992 cité par Calmel, 1996). La répartition des micro-organismes dans la rhizosphère n'est pas aléatoire ; elle est le résultat du pouvoir compétitif de ces micro-organismes. En général, ils ont tendance à coloniser les jonctions cellulaires et les zones d'émergence des racines (zones d'exsudation intense) soit 10% seulement de la surface racinaire (Bowen et Rovira, 1976 cité par Courtade, 1997). En effet, Fuiki *et al.* (1994) ont montré que la colonisation de la spermosphère des graines de la betterave à sucre par les

bactéries antagonistes (les souches 33-2 et *ML5* de *P. putida* et la souche GB02 de *B. subtilis*) n'est pas homogène et l'observation des graines au microscope électronique à scanner (SEM=Scanning electron microscope) a révélé que les sites à forte exsudation racinaire sont les plus colonisés par ces bactéries.

3.2-Action indirecte

Ce mode d'action des PGPR antagonistes est expliqué par l'induction de la résistance naturelle des plantes contre les maladies (Digat *et al.* 1993). Lors de ce phénomène appelé aussi « résistance systémique induite » (RSI), des rhizobactéries non pathogènes peuvent conférer à la plante un certain degré de protection à des attaques ultérieures par un phytopathogène (ou un agent délétère) via la stimulation de mécanismes de défense systémiques. Cette « immunité » s'initie suite à la perception par la plante de molécules dites élicitrices produites par le microorganisme bénéfique (Jourdan, 2008). Bien qu'il n'existe que peu d'exemples d'application pratique de la résistance induite en tant que méthode de lutte contre les maladies des plantes, les résultats obtenus à partir de quelques expériences menées en plein champ et en serre sont encourageants et indiquent que cette approche a le potentiel de devenir une stratégie de lutte efficace et durable contre toute une gamme d'agents phytopathogènes (Benhamou et Picard 1999). Ainsi dans leur rapport ancien, Wei *et al.* (1991) ont pu montrer que des souches du genre *Pseudomonas* suppriment l'antracnose par l'induction de la résistance systémique des plantes vis-à-vis de *Colletotrichum orbiculare*. Ces auteurs ont effectivement adopté un système qui sépare les antagonistes et le pathogène dans l'espace, ce qui leur a permis de conclure que la suppression de cette maladie dans ce système n'était pas due à un antagonisme direct (au vrai sens du terme) ou à une compétition mais à une induction de la résistance naturelle de la plante. Cette induction de la résistance peut se faire par différents mécanismes :

- ◆ L'inoculation par la bactérie antagoniste peut induire des modifications morphologiques et cytologiques chez la plante la rendant ainsi moins sensible à l'attaque de l'agent pathogène. C'est le cas par exemple de la souche de *P. putida* qui entraîne chez l'haricot l'augmentation de la teneur en lignine, lui conférant ainsi une résistance à *Fusarium solani* (Anderson et Guerra, 1985).
- ◆ L'inoculation par les antagonistes peut induire la synthèse de molécules dans les tissus internes des plantes ce qui leur confère une certaine immunité contre les agents pathogènes. En effet, l'inoculation des racines d'œillet par une bactérie du genre

Pseudomonas les protège contre la Fusariose vasculaire. Cette résistance semble être associée à l'accumulation de Phytoalexines au niveau de la plante (Van peer *et al.* 1991). Jourdan, 2008 a rapporté une nette augmentation d'activités enzymatiques de la voie des oxylipines (activités lipoxygénase (LOX) et lipide hydroperoxydase) dans les feuilles du tabac après infection avec des antagonistes. Il a aussi prouvé, lors d'une exploration plus approfondie sur des suspensions de cellules de tabac en culture avec la surfactine, l'induction de plusieurs autres mécanismes précoces de défenses, comme une alcalinisation du milieu extracellulaire, la production d'espèces oxydantes, l'activation d'enzymes de défense telles que LOX et phenylalanine ammonia lyase (PAL), et une possible réorientation de la voie des phénylpropanoïdes.

IV- L'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents

Dans la littérature, plusieurs méthodes sont décrites pour l'identification des *Pseudomonas* spp. Il s'agit d'une part de techniques classiques faisant appel à une caractérisation phénotypique se basant sur des critères morphologiques, biochimiques et physiologiques. Et d'autre part, de techniques de biologie moléculaire basées sur une caractérisation génotypique. Les études récentes de ce groupe de bactéries se basent sur une approche poly phasique combinant à la fois des outils phénotypiques et d'autres moléculaires dans le but d'augmenter la fiabilité de l'identification.

1- Identification phénotypique

Bossis (1995) cité par Bossis *et al.* (2000), a proposé une clé dichotomique pour l'identification des *Pseudomonas* fluorescents en se basant sur des caractères phénotypiques tels que la fluorescence, l'oxydase, la capacité de réduire la gélatine, le tréhalose et bien d'autres. Cette clé permet de discriminer entre les deux principaux groupes de ces *Pseudomonas* à savoir *P. fluorescens* et *P. putida*.

Ces dernières années des automates ont été fabriqués pour faciliter la caractérisation phénotypique des isolats bactériens. Parmi les automates d'identification phénotypiques utilisées qui sont utilisés pour les *Pseudomonas* spp. on trouve :

- ◆ les Kits d'identification QTS24 (Mehnaz *et al.* 2009),
- ◆ les systèmes Biolog GN (Rangel-Castro *et al.* 2002 ; Behrendt *et al.* 2003)
- ◆ et les galeries API (Biomérieux). ces galeries comptent plusieurs types selon le groupe de bactéries à identifier. On en cite :

- Les galeries 50CH (Mehnaz *et al.* 2009)
- Et les galeries 20NE (Wiedmann *et al.* 2000 ; Franzetti et Scarpellini, 2007 ; Pastor *et al.* 2010 ; Pastor *et al.* 2012 ; Elbanna *et al.* 2010).

Le principe de tous ces Kits et galeries repose sur la détermination des aptitudes métaboliques et la capacité d'utilisation de différentes sources de carbones des bactéries en question.

Un autre aspect est analysé au cours de l'identification phénotypique à savoir, l'évaluation des différentes activités enzymatiques tels que la catalase, l'oxydase, la protéase, la lécithinase...etc. Généralement les études phénotypiques sont complétées par la réalisation des profils des acides gras (Fatty Acids) et des profils des enzymes multi locus.

Bref, dans tous les labos, l'identification débute par une observation des caractères morphologiques au microscope, puis une analyse phénotypique par galerie ou kit pour faire une sorte de discrimination entre les différentes souches ; les résultats obtenus sont ensuite confirmés ou non par des analyses complémentaires (analyse génotypique). On doit absolument garder en tête que chaque technique comporte une ou plusieurs limites et c'est la confrontation des divers résultats obtenus (via des techniques multiples) qui permet de se prononcer (Bossis *et al.* 2000 ; Peix *et al.* 2009).

2- Identification moléculaire

Jusqu'à présent, la caractérisation des *Pseudomonas* spp. fait recours en premier lieu aux méthodes traditionnelles, en utilisant les clés dichotomiques de Palleroni (1984), Jacques (1994) et Bossis (1995). Ces clés permettent une identification facile des espèces et des biovars (Bossis *et al.* 2000). Cependant, cette méthode présente deux limites majeures d'une part, elle attribue une grande importance à quelques propriétés tout en négligent bien d'autres et d'autres part ; le nombre des propriétés considérées est très petit (Bossis *et al.* 2000). Les études récentes, de Peix *et al.* (2009) et celle de Mullet *et al.* (2010) entre autres, ont permis de conclure que les méthodes phénotypiques appliquées au groupe si hétérogène des *Pseudomonas* spp., et qui est en évolution continue, permettent la caractérisation de ces bactéries et non pas leur identification. En effet, ces méthodes phénotypiques manquent de reproductibilité et induisent des erreurs d'identification. Le progrès qu'a connu la biologie moléculaire a permis à une nouvelle approche d'identification de voir le jour ; Il s'agit de l'identification génotypique ou moléculaire. Cette identification repose sur des outils de la biologie moléculaire et elle a pour objectif principal de surmonter les inconvénients et les

handicaps posés par l'identification phénotypique. Le tableau I.13 résume les différentes techniques adoptées à nos jours pour l'identification moléculaire des procaryotes. Ces méthodes même si elles sont différentes en apparence, elles suivent le même canevas ; après l'extraction de l'ADN une amplification par PCR est réalisée avec des amorces spécifiques avec ou sans restriction. Les produits de la PCR sont ensuite séparés par électrophorèse et l'étude du polymorphisme est faite selon la technique soit après clonage ou après séquençage.

Le séquençage des régions particulières des génomes reste la méthode la plus utilisée et la plus fiable surtout s'il est précédé par un clonage (Huybens *et al.* 2009). Les régions ciblées par le séquençage sont nombreuses et on en cite celles codant pour :

- ✓ les différents ARNr (ARNr 16S, ARNr 23S, ARNr 5S (LMW) ainsi que les différents espaces inter géniques de l'ARNr 16S-23S (nommé ITS) (Figure I.15),
- ✓ L'ARNt (LMW) (Hofle, 1988),
- ✓ Les gènes de ménages dits « Housekeeping » comme *recA*, *atpD*, *carA*, *gyrB*, *rpoB* etc.) (Hilario *et al.* 2004)

Les ARNr sont les gènes les plus visés par les taxonomistes puisqu'ils codent pour des molécules ayant un degré d'évolution suffisamment élevé pour déceler d'éventuelles variabilités entre les espèces et un degré de conservation suffisant pour s'assurer que les différences correspondent à des catégories taxonomiques stables comme les genres et les espèces. Entre tous les ARNr bactériens, seul le gène de l'ARN 16S présente les deux caractéristiques requises ; l'ARN 23S est excessivement conservé et l'ARN 5S est très petit (Peix *et al.* 2009). C'est pour cette raison que le gène de l'ARNr 16S est considéré pour plusieurs taxonomistes comme la molécule clé de la classification des procaryotes, y compris les espèces du genre *Pseudomonas*, (Anzai *et al.* 2000 ; Palleroni, 2005, Palleroni, 2010).

Ces dernières années, plusieurs chercheurs ont comparé la fiabilité de plusieurs méthodes d'identification moléculaires pour la phylogénie du groupe *Pseudomonas* isolés de différents environnements. Les résultats recueillis ont montré que le séquençage de l'ARNr 16S doit être associé à celui d'autres gènes comme les gènes de ménage « Housekeeping » tel que le gène *rpoB* de l'ARN polymérase. En effet, Ait Tayeb *et al.* (2005) ont obtenu une résolution de l'arbre phylogénétique avec ce dernier gène trois fois plus grande que celle du gène de l'ARNr 16S. Ce constat a été expliqué par le fait que les *Pseudomonas* spp. possèdent plusieurs copies du gène de l'ARNr 16S alors qu'ils n'ont qu'une seule et unique copie du gène *rpoB* (Ait Tayeb *et al.* 2005).

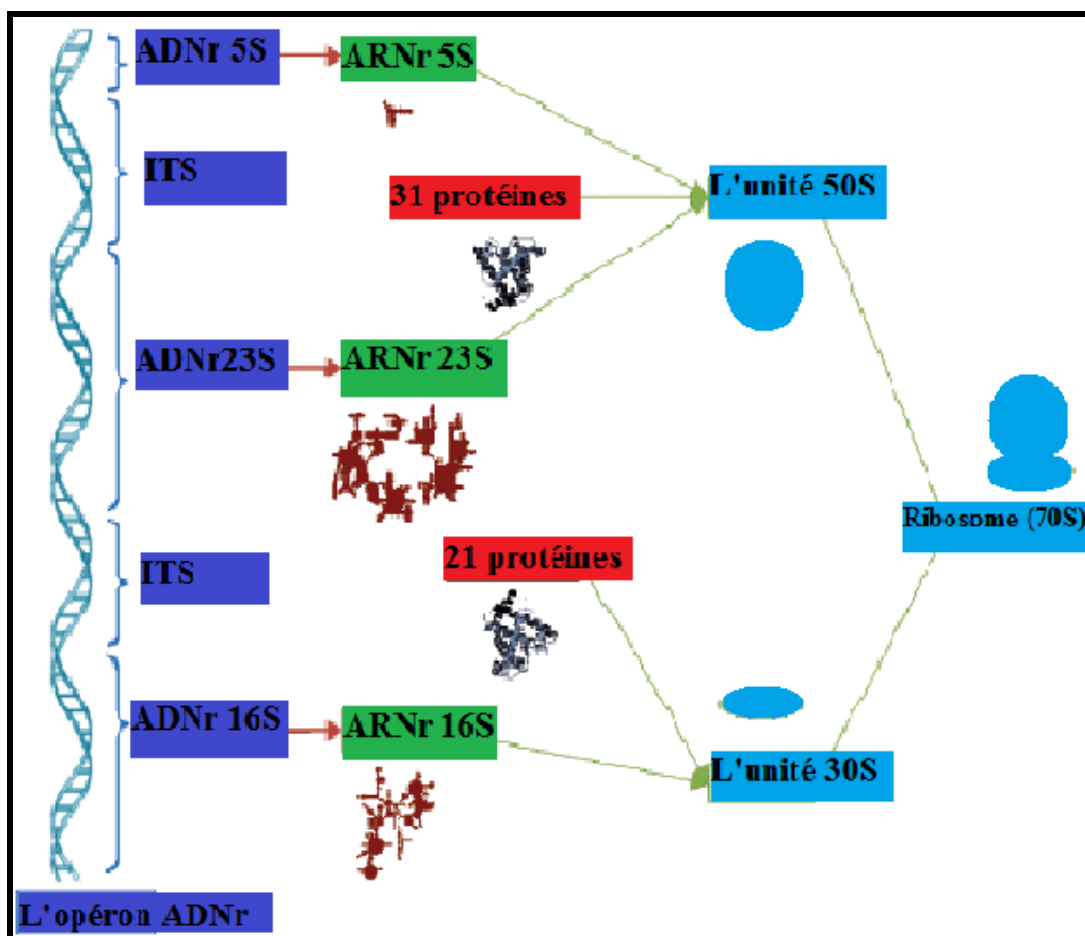


Figure I.15 : Composition du ribosome des procaryotes et de l'opéron de l'ADNr (Huybens *et al.* 2009).

En termes de conclusion, la définition des espèces bactériennes ainsi que la description de nouvelles espèces ou sub-espèces à l'intérieur d'un genre donné, est gérée par les standards généraux minimaux (General minimal standards) définis par le comité formé par des experts de ce genre (Peix *et al.* 2009). Ces standards incluent le séquençage de l'ARNr 16S, l'hybridation ADN-ADN, l'analyse des profils des acides gras et la caractérisation phénotypique (Stackebrandt *et al.* 2002). Dans le futur, la taxonomie du genre *Pseudomonas* doit surmonter plusieurs challenges dictés par le nombre élevé des espèces de *Pseudomonas* décrites lors de cette dernière décennie, qui admet le fait que c'est le genre bactérien le plus répandu dans le monde et le plus complexe. En effet, différentes espèces ont été isolées à partir de différentes niches écologiques (Peix *et al.* 2009) ce qui implique une révision continue des banques de données moléculaires et la nécessité de les classer en fonction des niches écologiques et des écosystèmes pour faciliter les études taxonomiques de ce genre (Rangel-Castro *et al.* 2002).

Tableau I.13 : Les avantages et les inconvénients des différentes méthodes moléculaires utilisées pour l'identification et l'étude des procaryotes (D'après Huybens *et al.* 2009).

Techniques	Avantages	Inconvénients
PCR aléatoires (RAPD, AP-PCR et DAF)	Pas besoin d'équipement spécifique Les bandes d'intérêts peuvent être excisées du gel	Manque de reproductibilité. Présence d'artefacts (amplification dans le témoin négatif)
AFLP	Possibilité de tester in silico pour choisir les enzymes intéressantes. Permet de différencier des espèces voir des sous espèces. Compatible avec une analyse automatisée	Demande beaucoup de temps
REP	Pas besoin d'équipement spécifique. Les bandes d'intérêts peuvent être excisées du gel	Les séquences présentes entre les REP peuvent être très variables au sein d'une même espèce
RISA	Pas besoin d'équipement spécifique. Les bandes d'intérêts peuvent être excisées du gel	Une seule espèce peut avoir plusieurs signaux
ARDRA	Pas besoin d'équipement spécifique	Plusieurs restrictions nécessaires pour trouver une résolution adéquate. Demande beaucoup de temps
SSCP	Pas besoin d'amorce avec pince GC. Les bandes d'intérêts peuvent être excisées du gel. Compatible avec une analyse automatisée (CE-SSCP)	Taux élevé de ré appariement des brins d'ADN. Une espèce peut présenter plusieurs bandes
DGGE / TGGE	Les bandes d'intérêts peuvent être excisées du gel. Peu cher	Sensibilité limité. La pince GC diminue la rentabilité de la PCR et favorise la formation de dimère. La manipulation du gel demande de l'expérience
T-RFLP	Haute sensibilité ; Rapide. Permet une comparaison entre les différents essais	Restriction incomplète entraine une surestimation d'une espèce. Plusieurs restrictions sont nécessaires pour une analyse complète. Les profils complexes sont difficiles à interpréter de point de vue phylogénique
ARISA	Permet de détecter de très légères différences de population. Compatible avec RFLP et séquençage pour des analyses complémentaires	Une seule espèce peut avoir plusieurs signaux
Séquençage	La plus haute résolution phylogénique. Permet l'identification de l'espèce	Il est consommateur du temps surtout s'il passe par le clonage

Par ailleurs, en plus de l'hétérogénéité au niveau de l'espèce du genre *Pseudomonas*, une grande diversité intra spécifique est notée au sein des espèces. Parfois le degré élevé de cette diversité nécessite la catégorisation des genomovars. C'est ainsi que Mulet *et al.* (2008) ont décrit des genomovars au sein de *Pseudomonas stutzeri* en étudiant la production des sidérophores et des pigments fluorescents par cette espèce. Van Felten *et al.* (2011) ont proposé une nouvelle méthode pour l'investigation de six groupes de *Pseudomonas* producteurs du 2,4-diacetylplloroglucinol dans des échantillons pris de l'environnement (sol, eau...).

Dans le futur, les études porteront sans doute sur le séquençage de plus en plus complet des génomes du genre *Pseudomonas* (Duan *et al.* 2013). Ce séquençage éclaircira les mécanismes qui gèrent la diversité génétique et écologique de ce genre complexe. Il va aussi clarifier les relations phylogénétiques et la taxonomie des différents taxons associés au genre *Pseudomonas*. L'analyse de plusieurs séquences dans le cadre de ce qu'on appelle MLSA (Multilocus Sequence Analysis) ou MLST (Multilocus Sequence Typing) a été déjà réalisée pour l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* et ce en combinant plusieurs gènes de ménage pour l'établissement d'une séquence contigüe qui a servi à la réalisation d'une phylogénie fiable (Khan *et al.* 2008). Bennasar *et al.* (2010) ont mis au point une base de données nommée PseudoMLSA qui rassemble toutes les souches et les séquences des espèces dont la description est valide et qui appartiennent au genre *Pseudomonas*. Cette base de données est accessible à partir de l'adresse suivante : <http://www.uib.es/microbiologiaBD/Welcome.html>. Le principe de cette base est de mettre à la disposition des chercheurs un arsenal de séquences des gènes les plus investigués pour l'identification précise des isolats de *Pseudomonas* spp. *fluorescents*. Parmi ces gènes on trouve notamment celui de l'ARNr 16S ainsi que plusieurs gènes de ménage tels que *rpoB*, *rpoD*, *recA*...etc. la Figure I.16 représente un schéma illustratif du fonctionnement de cette base de données. Elle contient 305, 261, 228, 189, 80, 33, 13 et 6 séquences du *rpoD*, de l'ARNr 16S, du *gyrB*, du *rpoB*, de *recA*, des ITS1, du *atpD* et de l'ARNr23S respectivement. L'analyse contigüe de ces séquences aide à mieux élucider la phylogénie des *Pseudomonas* spp.

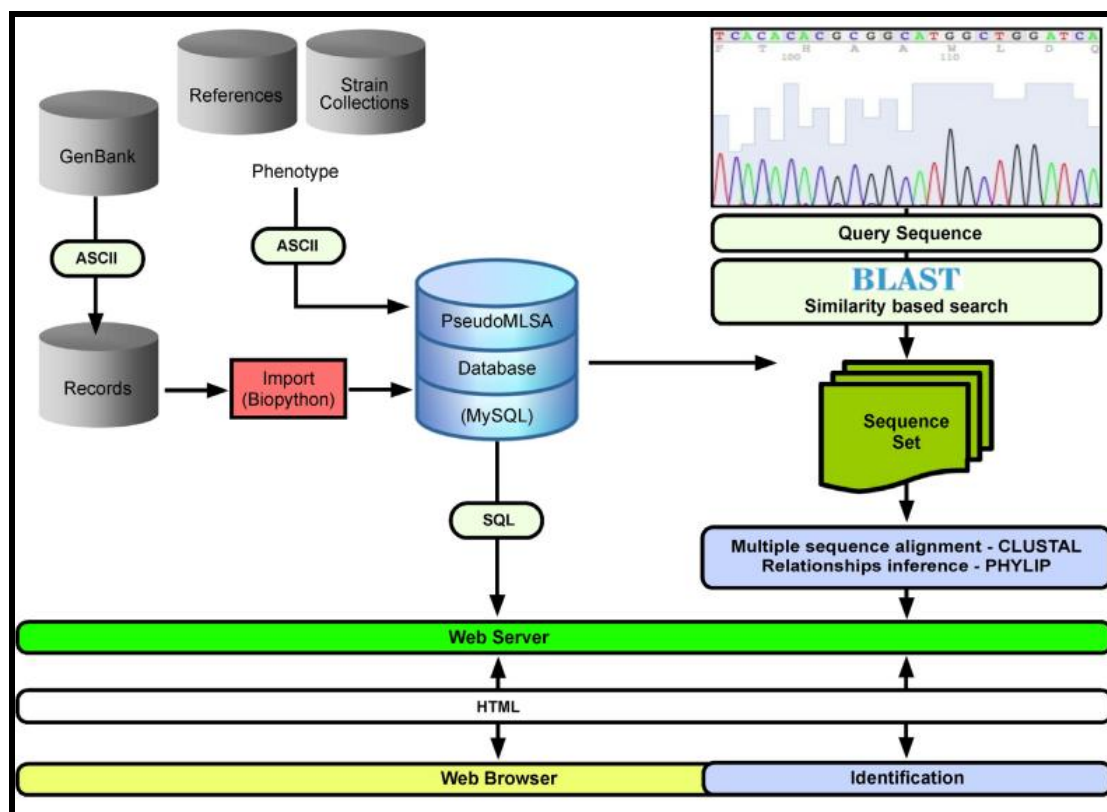


Figure I.16 : Schéma illustratif du fonctionnement de la base de données PseudoMLSA (Bennasar *et al.* 2010).

V. Les PAM et la lutte biologique

1- Les plantes médicinales et aromatiques au Maroc

Le Maroc est un pays méditerranéen caractérisé par une diversité remarquable qui se manifeste à plusieurs niveaux : le relief, la lithologie, le sol, la biogéographie (climat, bioclimat, et étage de végétation) et le réseau hydrographique (Benabid, 2000). Toutes ces conditions contribuent pour rendre le Maroc un des pays les plus riches en végétation dans la zone du bassin méditerranéen. La flore marocaine compte environ 4200 espèces et sous espèces réparties entre près de 150 familles et 940 genres (Msanda *et al.* 2005). Parmi cette flore figurent environ 500 espèces de plantes aromatiques et médicinales (PAM) (15% de la flore) dont un grand nombre sont endémiques (El Rhaffari et Zaid, 2002 ; Msanda *et al.* 2005). Le secteur des plantes aromatiques et médicinales recouvre une réalité diverse et complexe liée à différents facteurs :

- un grand nombre d'espèces concernées ;
- des modes d'élaboration et de transformation multiples ;

- un secteur utilisateur multiforme, couvrant l'agroalimentaire, les arômes, la pharmacie, le cosmétique, la parfumerie et la lutte biologique ;
- un marché international très concurrentiel ;
- une grande influence des évolutions technologiques et des tendances de la consommation.

C'est ainsi que les PAM constituent une gamme diversifiée de produits, provenant soit de la simple cueillette par les usagers, soit de l'exploitation par des entreprises. Ces produits présentent un intérêt socio-économique important au niveau national, régional et local et qui suscite un vif intérêt du marché extérieur (Benjilali et Zrira, 2005). Actuellement, le Maroc réalise des productions importantes en plantes aromatiques et médicinales (PAM) et leurs dérivés, ce qui lui confère une place non négligeable sur le marché international (Zrira, 2006). Cette production est globalement assurée par les PAM spontanées, alors que celles cultivées ne contribuent qu'à 2 % environ (El Rhaffari et Zaid, 2002). Les exportations marocaines en huiles essentielles ne cessent d'augmenter ces dernières années et rapportent d'importantes devises (~ 112,4 millions de dh en 2003) (Anonyme, 8).

2. Exemples d'essais de lutte contre les phytopathogènes avec des PAM

Ces dernières années, le recours aux plantes aromatiques et médicinales pour extraire des molécules à activité bactéricide et/ou fongicide envers les phytopathogènes est en accroissement continu. Daferera *et al.* (2003) ont testé l'efficacité de sept huiles essentielles envers quelques pathogènes des plantes comme *Botrytis cinerea* et *Fusarium* sp. Les résultats obtenus ont révélé une inhibition totale de la croissance de *B. cinerea* et *Fusarium* sp. à des concentrations relativement faibles (85 à 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$) en huiles essentielles d'*Origanum vulgare*, de *Thymus capitatus*, d'*Origanum dictamnus* et d'*Origanum majorana*. Thiem et Goślińska (2004) ont montré que les extraits des feuilles de *Rubus chamaemorus* sont dotées d'une activité antibactérienne envers certaines bactéries Gram négatif. Selon ces auteurs, cette activité antibactérienne peut être expliquée par la teneur élevée en tanins. Basim *et al.* (2004) ont montré que l'huile essentielle de *Rosa damascena* peut être utilisée pour le contrôle d'*Erwinia amylovora* chez les rosacées fruitières. Hanning *et al.* (2008) ont montré que *Cistus tea* a une activité antibactérienne. Cette activité est liée à la richesse de cette espèce en polyphénols connus pour leur propriété antibactérienne. C'est dans le même contexte que Bouamama *et al.* (2006) ont montré que les feuilles de *Cistus villosus* et *C. monspeliensis* possèdent une activité antibactérienne envers quelques bactéries à Gram négatif. Cakir *et al.*

(2005) ont étudié les propriétés antifongiques de l'huile essentielle et des extraits secs de *Hypericum linarioides* Bosse envers 11 champignons phytopathogènes. (Cakir *et al.* 2005). Ces auteurs ont constaté que l'huile testée inhibe la croissance mycélienne de tous les champignons quand elle a été utilisée à une concentration de 5 mg ml⁻¹. En ce qui concerne les extraits secs, préparés avec différents solvants organiques, ils ont montré une activité antifongique envers six champignons, à savoir *Fusarium acuminatum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. sambucinum* et *Verticillium albo-atrum*. Toutefois, ceux ayant été préparés avec le méthanol et l'acétone sont les plus actifs, ce qui suggère que ces deux solvants sont les meilleurs pour extraire les molécules antifongiques à partir d'*Hypericum linarioides* Bosse (Cakir *et al.* 2005).

Basim *et al.* (2006) ont testé *in vitro* l'effet des extraits de pollen de certaines plantes contre 13 agents phytopathogènes incluant *Agrobacterium tumefaciens*, *A. vitis*, *C. m.* subsp. *michiganensis*, *Erwinia amylovora*, *E. carotovora* pv. *carotovora* et *Pseudomonas corrugata*. Les résultats obtenus ont montré qu'*Agrobacterium tumefaciens* est la bactérie la plus sensible puisque l'extrait de pollen, à la concentration de 1/5, a donné une zone d'inhibition de l'ordre de 12 mm de diamètre. El Allagui *et al.* (2007) ont évalué l'action des extraits aqueux de cinq espèces végétales sur la mortalité des nématodes à galles chez la tomate. Les résultats ont révélé une action nématocide intense *in vitro* allant de 60 à 95%. Pouvova *et al.* (2008) ont testé l'efficacité *in vitro* de 34 huiles essentielles envers deux sub-espèces de *C. michiganensis*. Huit des huiles testées ont fortement inhibé la croissance des deux pathogènes, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* et *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* avec des zones d'inhibition allant de 10,33 à 30,17 mm de diamètre. Park *et al.* (2008) ont testé l'efficacité *in vivo* des extraits méthanoliques de 27 PAM orientale envers six champignons phytopathogènes. *Lysimachia foenum-graecum* montre la plus importante activité antifongique à une concentration de seulement 0,5 mg ml⁻¹ envers *Magnaporthe grisea*. Joseph *et al.* (2008) ont évalué la bio-efficacité *in vitro* des extraits de cinq plantes aromatiques et médicinales dans le contrôle de *F. oxysporum* f. sp. *melongenae* responsable du flétrissement de l'aubergine. Tous les extraits testés ont une activité inhibitrice de ce pathogène. L'extrait à 20% de *Azardiachta indica* s'est montré le plus efficace. Zarins *et al.* (2009) ont étudié l'activité biologique de plusieurs extraits de plantes et ont prouvé leur possible application comme bio pesticide inoffensif aux vertus fongicides et insecticides. Plus récemment, Sarah *et al.* (2012) ont testé l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles de *Psidium guyajava* contre six phytopathogènes appartenant aux genres *Pectobacterium* et

Xanthomonas. *Xanthomonas oryzae* est le pathogène le plus sensible à cet extrait quelle que soit la concentration utilisée. En effet le diamètre de la zone d'inhibition a atteint 25 mm de diamètre à la concentration de 200 mg ml⁻¹ et la CMI n'était que de 0,391 mg ml⁻¹ (Sarah *et al.* 2012). L'utilisation des plantes et de leurs extraits a intéressé aussi les chercheurs dans le domaine de la post récolte, en médecine humaine et en industries agro-alimentaires. D'intéressants résultats ont été collectés (Hernández *et al.* 2005 ; Bouamama *et al.* 2006 ; Ameziane *et al.* 2007; Tzortzakis et Economakis, 2007 ; Imelouane *et al.* 2009 ; Sisti *et al.* 2008 ; Talibi *et al.* 2012 a -b; Askarne *et al.* 2012 ; Askarne *et al.* 2013 etc.). L'agent du chancre bactérien de la tomate a aussi fait l'objet de plusieurs recherches scientifiques en termes de lutte biologique à base de différentes fractions et extraits de plantes aromatiques et médicinales autour du monde. C'est ainsi que Daferera *et al.* (2003) ont testé l'activité antagoniste des huiles essentielles de plusieurs plantes aromatiques contre des pathogènes de plantes dont celui du chancre bactérien de la tomate. Les résultats obtenus par ces auteurs montrent que *C. m. subsp. michiganensis* est très sensible aux huiles essentielles et principalement à ceux riches en Thymol (Daferera *et al.* 2003). Les extraits de pollen de certaines plantes sont aussi testés contre ce pathogène (Basim *et al.* 2006). En effet, *C. m. subsp. michiganensis* s'est montré très sensible aux extraits de pollen des plantes testés. Balestra *et al.* (2009) ont évalué l'activité antibactérienne *in vitro* et *in vivo* des extraits aqueux de deux plantes médicinales, *Allium sativum* et *Ficus carica*, contre des agents pathogènes de la tomate dont celui du chancre bactérien. Les résultats obtenus étaient très satisfaisants puisque la réduction de l'incidence de cette bactériose *in vivo* a atteint 65% et 38% quand les plants de tomate sont traités, respectivement, par les extraits d'*Allium sativum* et de *Ficus carica* (Balestra *et al.* 2009).

CHAPITRE II

Collection et étude des isolats du pathogène ;

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*

I- Introduction

Chaque recherche dans le cadre de la lutte biologique et/ou intégrée ne saurait être efficace que si on menait au préalable une étude approfondie de l'agent pathogène responsable de la maladie pour laquelle les méthodes de lutte fiables vont être recherchées. Linderman 1983, cité par Boudyach 2004, avance que la maîtrise d'une lutte biologique contre un agent phytopathogène donné nécessite la connaissance de la biologie du pathogène et de la maladie qu'il cause ainsi que sa distribution géographique et les facteurs abiotiques, surtout édaphiques, qui agissent sur l'expression de la maladie. Dans le but d'approfondir nos connaissances acquises lors de l'étude bibliographique relative à *C. m. subsp. michiganensis*, nous avons consacré une partie de cette recherche à l'étude de cette bactérie phytopathogène. L'objectif de cette démarche est de préparer d'abord une collection d'isolats de *C. m. subsp. michiganensis* ensuite d'évaluer le pouvoir pathogène de ces isolats présents dans la région de Souss-Massa Draa.

II- Matériel Et Méthodes

1- Prospection et prélèvement des échantillons

De nombreuses sorties de prospection ont été réalisées dans la région du Souss-Massa Draa au cours de la période allant de 1998 à 2007. Treize exploitations de production de la tomate aussi bien sous serre qu'en plein champ ont été visitées dans l'axe Ait Melloul-Biougra. Des échantillons ont été prélevés à partir des plants présentant des symptômes caractéristiques du chancre à savoir le flétrissement unilatéral des feuilles et le brunissement de leurs bordures. Les prélèvements sont réalisés en sectionnant les tiges à l'aide d'un sécateur stérile. Les échantillons prélevés sont placés dans des sachets en plastique, étiquetés puis ramenés au laboratoire de biotechnologies et valorisation des ressources naturelles (LBVRN) à la faculté des sciences d'Agadir. Une fois au laboratoire, les isolements sont réalisés souvent le même jour. Dans le cas échéant, les échantillons nettoyés sont conservés au réfrigérateur (4 à 5°C) et sont analysés au plus tard le lendemain (en moins de 24h).

2- Isolement et identification

Après leur nettoyage avec un détergent non anionique (détergeant liquide de vaisselle) et l'eau du robinet, les échantillons sont désinfectés par immersion, durant 10 mn, dans une solution commerciale d'eau de Javel 12°. Après cette désinfection, ils sont lavés à l'eau distillée stérile puis séchés sous une hotte à flux laminaire. Ensuite, l'écorce est enlevée délicatement à l'aide d'un scalpel stérile. Des morceaux de vaisseaux conducteurs avec

brunissement sont ensuite détachés et mis dans une boîte de Pétri stérile contenant quelques gouttes d'eau distillée stérile (EDS). Ces boîtes de Pétri sont laissées reposer pendant 20 mn sous agitation. Ensuite, une goutte de la suspension obtenue est utilisée pour l'ensemencement par épuisement du milieu gélosé au bouillon nutritif et à l'extrait de levure (NBY, Annexes) (Vivader, 1967). D'autres boîtes contenant le même milieu sont ensemencées par dépôts de fragments de 3 à 4 mm découpés au niveau de la même zone infectée. Les boîtes ainsi ensemencées sont incubées à 26°C pendant 2 à 3 jours. Tous les isolements sont répétés trois fois.

3- Purification et conservation des isolats

Après incubation, les colonies qui se sont développées, de couleur jaune, de forme arrondie, lisses, convexes et brillantes sont repérées. Elles sont supposées correspondre à celles de *C. m. subsp. michiganensis*. La purification est faite par repiquage successif par la méthode d'épuisement sur le même milieu cité précédemment ; à partir des colonies bien individualisées. La pureté est confirmée par des observations microscopiques de différents frottis bactériens colorés (au bleu de méthyle ou avec les colorants de Gram) préparés à partir des cultures présumées pures. La présence de cellules corynoformes, Gram positifs, non sporulantes et présentant des arrangements en V et/ou en Y confirme la pureté des cultures. Les isolats bactériens ainsi purifiés sont conservés à 4°C sur milieu gélosé glucosé à l'extrait de levure et au carbonate de calcium (YDC) en tubes inclinés pour une conservation à moyen terme (3 mois au maximum) (Wilson *et al.* 1967). Une conservation à long terme est réalisée dans du glycérol 40% à -80 C (Parke *et al.* 1986). Les tubes sont bien étiquetés avec la date et le code correspondant.

4-Etude du pouvoir pathogène des isolats

Quatre tests sont réalisés pour évaluer le pouvoir pathogène des isolats dans le but de sélectionner l'isolat le plus virulent et qui sera utilisé dans les essais ultérieurs :

- Hypersensibilité sur des feuilles de tabac (*Nicotiana tabacum* L.) (Klement *et al.* 1963).
- Dessèchement des cotylédons des jeunes plantules de tomate (Chaldocotte et Pearce, 1983).
- Induction des taches en œil d'oiseaux sur jeunes fruits de tomate (Medina-Mora *et al.* 2001).
- Flétrissement des plantules de tomate.

L'étude du pouvoir pathogène a été réalisée avec quatre isolats à savoir CmmJS07, CmmJS05 et Cmm1 isolés dans le cadre de cette étude ainsi que CmmH195 qui est une souche de référence dont la virulence et la pathogénie ont été largement étudiées par Boudyach *et al.* 2001 et 2004.

4.1-Test d'hypersensibilité sur des feuilles de tabac

Le test est réalisé sur des plants de tabac (*Nicotiana tabacum* L.), ramenés de la serre du complexe Horticole de l'IAV d'Agadir, avec des feuilles bien développées (stade 4^{ème} ou 5^{ème} vraie feuille). Pour ce faire, des cultures jeunes (48 à 72 h d'incubation) des différents isolats de *C. m. subsp. michiganensis* sont préparées sur la gélose NBY à partir des cultures conservées. Des suspensions sont réalisées à partir des cultures jeunes dans l'eau physiologique stérile (NaCl 0.85%). La concentration est ajustée à $\sim 10^8$ UFC. ml⁻¹ (DO=0.46 à 540 nm, Umesha (2006)). Des feuilles saines et assez grandes sont choisies sur plusieurs plants de tabac. A peu près 1 ml de chaque suspension bactérienne est injectée à l'aide d'une seringue stérile dans la nervure principale de la face dorsale de chaque feuille de manière à avoir une infiltration des cellules bactériennes dans les espaces intercellulaires (Alarcón 1998; Gitaitis 1990). Quatre feuilles sont inoculées à raison de quatre infiltrations par feuille. Les feuilles ainsi inoculées sont marquées et la réaction d'hypersensibilité, caractérisée par le dessèchement et la nécrose des tissus, est évaluée après 36 à 48 h.

4.2- Test de flétrissement et de dessèchement des cotylédons

Pour réaliser ce test, la méthode décrite par Chaldecott et Preece, 1983 a été adoptée avec quelques petites modifications. Des semences de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill, now *Solanum lycopersicum*, cv, clause 27, France) sont mises à germer dans des terrines alvéolées remplies d'un mélange sable-tourbe (1 : 2 / v : v). Les terrines sont placées dans une chambre de culture à conditions contrôlées avec une photopériode de 12 h, une T°max de 28°C, une T°min de 10°C et une humidité relative (HR) de 80% (Figure II.1). Elles sont arrosées tous les deux jours et fertilisées chaque semaine avec une solution nutritive commerciale (Poni NPK 20-20-20, Poni France). Au stade première vraie feuille (Figure II.2), la tige de chaque plantule est sectionnée 3 à 5 mm au-dessus des cotylédons à l'aide d'une paire de ciseaux stérile ensuite plongée dans une suspension de *C. m. subsp. michiganensis* à 10^8 UFC ml⁻¹. Le flétrissement et dessèchement des cotylédons est surveillé pendant 48 à 72 h. Des témoins négatifs sont préparés de la même manière en utilisant de l'EDS au lieu de la suspension bactérienne pour le trempage des ciseaux. 12 plantules (24 cotylédons) sont utilisées par traitement et elles sont disposées en trois blocs aléatoires de quatre plantules

chacun. L'expérience est refaite trois fois. La sévérité du dessèchement est estimée par détermination du pourcentage des cotylédons desséchés pour chaque isolat et la virulence est alors déduite de la comparaison de ces pourcentages.



Figure II.1 : Les terrines alvéolées placées dans une chambre de culture à condition contrôlées (photopériode de 12 h, une T° max de 28°C, une T° min de 10°C et une humidité relative (HR) de 80%).



Figure II.2 : Les plantules de tomate au stade première vraie feuille après 4 jours de la germination.

4.3- Induction des taches en œil d'oiseaux sur fruits

Afin de tester la sévérité des isolats de *C. m. subsp. michiganensis*, nous avons adopté la méthode décrite par Medina-Mora *et al.* 2001 que nous avons légèrement modifiée. Les plants de tomate utilisés sont issus d'une germination des semences de tomate (cv. Clause 27. France) dans des terrines alvéolées remplies d'un mélange de tourbe et de sable (2 : 1/ v : v). Le monitoring des plantes est fait sous serre contrôlée au complexe Horticole de l'IAV d'Agadir. La transplantation en pots plastiques remplis du même mélange de sol est faite au stade 2^{ème} vraie feuille. Les plants sont arrosés selon leur besoin ; en général chaque deux jours. La fertilisation est faite chaque semaine avec une suspension préparée comme indiqué à partir du fertilisant commercial Poni NPK 20-20-20 (Poni France). L'humidité relative est maintenue à un taux supérieur à 80% par utilisation de bacs remplis d'eau à l'intérieur de la serre. La température maximale (Tmax) avoisine 28°C le jour et la température minimale (Tmin) est de 10°C la nuit. La photopériode est de 12h. Des suspensions de l'agent pathogène sont préparées comme décrit précédemment à une concentration de 10⁸ ufc ml⁻¹. Les suspensions ainsi préparées sont appliquées sur la surface de jeunes fruits quelques temps après nouaison (10 mm de diamètre) à l'aide d'une brosse à poils fins. Cinq fruits sont traités par isolat. L'expérience est répétée deux fois. Des témoins sont préparés en suivant la même procédure en utilisant de l'EDS. Le nombre des taches par fruit est comptabilisé. Le pourcentage de fruits avec tache est aussi déterminé.

4.4- Test de flétrissement des plantules

Nous avons réalisé ce test afin d'évaluer la capacité de nos isolats de *C. m. subsp. michiganensis* à induire tous les symptômes du chancre parmi lesquels, le flétrissement unilatéral aussi bien des feuilles que des plants ainsi que le flétrissement systématique (généralisé). Ce test consiste en l'infection des racines des plantes au stade 2^{ème} vraie feuille par trempage dans des suspensions de *C. m. subsp. michiganensis* sans toucher les parties aériennes (Boudyach *et al.* 2004). Pour chaque isolat de *C. m. subsp. michiganensis*, des suspensions sont préparées comme décrit au préalable à une concentrations de 10⁸ ufc ml⁻¹. Quinze répétitions sont réalisées par isolat. Ces répétitions sont disposées en trois blocs de cinq plants chacun. Les pots sont placés dans une chambre de culture dont les conditions de température, de lumière et d'humidité sont les mêmes que celles précédemment décrites, Il en est de même pour la fréquence d'arrosage et du mode de fertilisation. Le suivi de l'apparition des symptômes sur les plants a duré 15 jours. La confirmation de l'infection set faite par le réisolement de chaque isolat à partir des plants présentant les symptômes sur le milieu semi

sélectif pour *Clavibacter* (SCM ; Fatmi et schaad 1988). L'évaluation de la virulence des isolats est faite par la détermination des tests positifs ainsi que la vitesse d'apparition des symptômes.

5- Analyse statistique

Tous les résultats obtenus sont analysés statistiquement par la réalisation d'analyse de variance ANOVA appropriées. Les pourcentages sont préalablement transformés en Khi carré. Le nombre moyen de taches par fruit est analysé statistiquement avec l'analyse de variance (ANOVA) en utilisant le test de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). La différence entre les traitements est déterminée par la méthode de Dunn. Le logiciel Statistica 6 est utilisé pour cette analyse statistique. Le choix de cette méthode d'analyse est basé sur le fait que les mesures ne sont pas distribuées normalement (selon la loi normale) et il n'y a pas une transformation appropriée d'où l'obligation d'avoir recours aux tests non paramétriques (Hoshmand, 1988 cité par Medina-Mora *et al.* 2001).

III- Résultats

1- Isolement et identification de *C. m.* subsp. *michiganensis*

A partir des 13 échantillons récoltés lors de notre prospection, nous avons pu obtenir dix isolats de *C. m.* subsp. *michiganensis*. Ceci a été réalisé en se basant sur les caractéristiques phénotypiques de cette bactérie sur des milieux spécifiques tel que :

- Le milieu NBY sur lequel les colonies bactériennes apparaissent jaunes, lisses, brillantes et convexes (Figure II.3, B). L'odeur est aussi très caractéristique.
- Le milieu SCM sur lequel les colonies bactériennes sont petites et d'une couleur grise avec au centre un petit point rosâtre (Figure II.3, C).

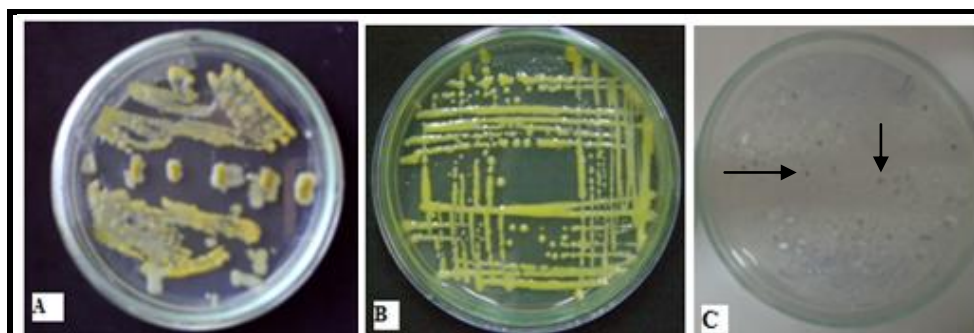


Figure II.3 : Isolement de *C. m.* subsp. *michiganensis* à partir des tiges de tomate présentant des symptômes du chancre bactérien.

A : Premier isolement. B : Purification par la méthode d'épuisement sur NBY. C : purification sur SCM.

Trois échantillons sur treize sont négatifs pour l'isolement de *C. m. subsp. michiganensis* malgré la présence du symptôme du flétrissement généralisé sur les plants au sein des exploitations. Le pourcentage de 76.92% (dix exploitations sur treize sont considérées positives pour *C. m. subsp. michiganensis*) constitue un pourcentage significatif et confirme l'importance de la maladie dans la région de Souss-Massa Draa et surtout dans l'axe que nous avons étudié (Ait Melloul-Biougra) ; qui se caractérise par un sol sablonneux et une culture intensive de la tomate. Le Tableau II.1 illustre les résultats recueillis lors de notre prospection.

Tableau II.1 : Résultats de la prospection réalisée dans de la région du Souss-Massa Draa

Exploitation	Origine	Culture ^a	Symptômes ^b	Sévérité ^c	Isolement de Cmm
1	Biougra	Daniella	F, D	2	+
2	Biougra	Daniella	F, D	4	+
3	Biougra	Daniella	F, BV	2	+
4	Ait Amira	Gabriella	F, D	3	+
5	Ait Amira	Vanama	F, BV	3	+
6	Ait Amira	Durinta	F, BV	2	+
7	Sidi Bibi	Cleopatra	F, BV	1	+
8	Sidi Bibi	Gabriella	F, D	2	+
9	Sidi Bibi	Daniella	F, BV, D	3	+
10	Tifnite	Daniella	F, D	3	-
11	Tifnite	Assala	F, BV	1	-
12	BenGamoud	Vanama	F, D	2	-
13	BenGamoud	Vanama	M	4	+

a : Culture sous serre avec différents portes greffes.

b : Les symptômes observés lors des sorties sont : F : flétrissement ; BV : brunissement des tissus vasculaires ; D : dessèchement des feuilles ; M : mort des plantes.

c : Sévérité de la maladie est estimée par l'échelle allant de 1 à 4 avec : 1 : attaque faible sur plants isolés ; 2 : attaque moyenne de 30% ; 3 : attaque sévère (plus de 60%) ; 4 : attaque très sévère (mort de plus de 50% des plantes de l'exploitation).

2- Etude du pouvoir pathogène

2.1- Tests d'hypersensibilité

Tous les isolats testés ont provoqué des réactions d'hypersensibilité positives sur les feuilles de Tabac. Ce résultat (Figure II.4) confirme le caractère phytopathogène des isolats testés. Toutefois, il faut noter que la vitesse d'apparition des réactions d'HS ainsi que le pourcentage des feuilles avec nécrose diffèrent d'un isolat à l'autre. Les isolats CmmJS07, CmmH195 et Cmm1 ont donné les meilleurs résultats avec plus de 80% de réactions HS en moins de 48h.



Figure II.4 : Réaction d'hypersensibilité sur feuilles de Tabac avec les isolats : Cmm1, CmmH195 et CmmJS07.

2.2- Test de flétrissement et dessèchement des cotylédons

Les cotylédons des plantules traitées par les suspensions pathogènes dessèchent après trois à quatre jours avec absence totale du dessèchement au niveau des témoins traités par l'EDS (Figures II.5).

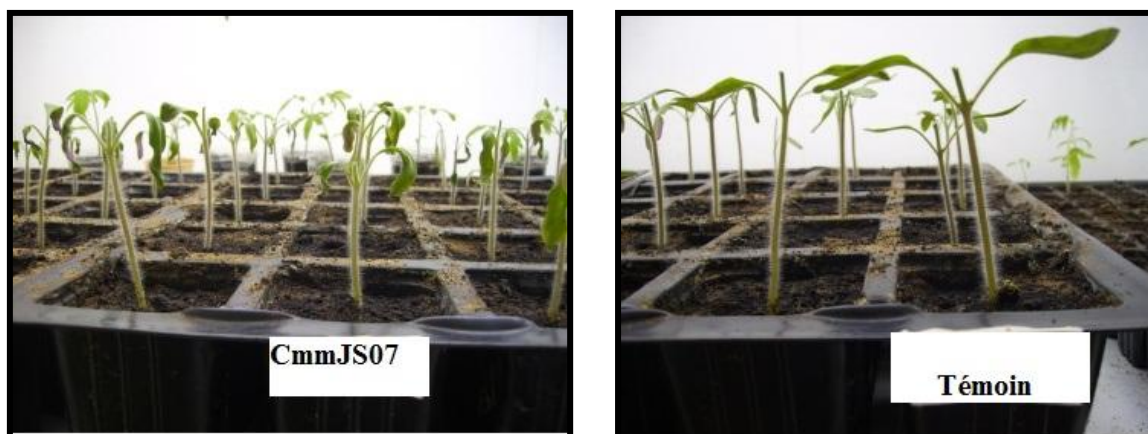
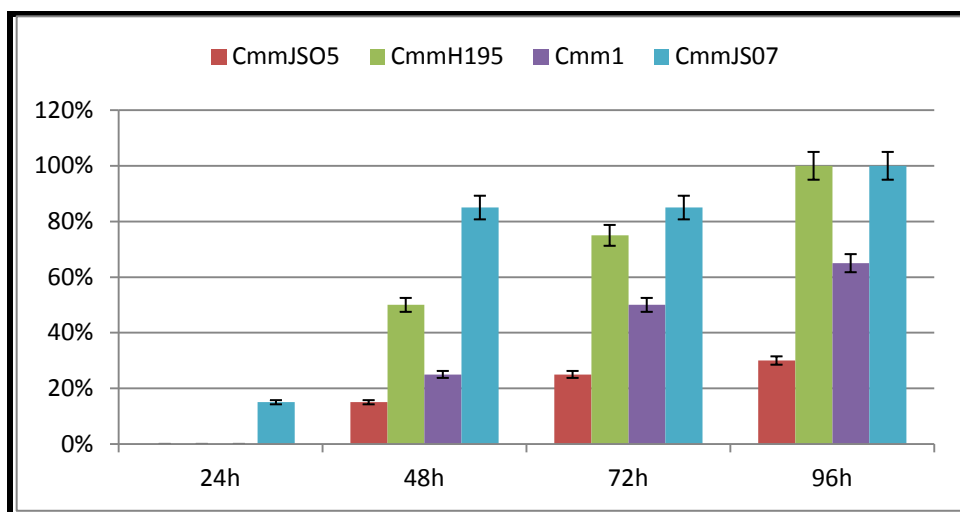


Figure II.5 : Test de dessèchement des cotylédons réalisé avec des plantules de tomate de quatre jours après la germination et l'isolat CmmJ07.

La vitesse d'apparition du dessèchement diffère d'un isolat à l'autre. En effet pour l'isolat Cmm JS07, 20% des plantes traitées présentent ce symptôme un jour après l'inoculation. Une différence significative est également relevée entre les isolats testés en

termes de pourcentage de cotylédons desséchés. Les isolats les plus virulents, d'après ce test, sont CmmJS07 et CmmH195, avec plus de 60% de cotylédons desséchés après 72h du traitement (Figures II.6).



Figures II.6 : Pourcentage des cotylédons desséchés après inoculation avec les quatre isolats pathogènes de *C. m. subsp. michiganensis*. Les cotylédons du témoin négatif traité avec l'EDS n'ont pas desséché tout le long de l'essai.

2.3- Test d'induction des taches en œil d'oiseaux

Dix jours après l'infection des fruits, nous avons noté l'apparition de taches blanches en relief à la surface des fruits traités. Après 8 à 10 jours de leur apparition, les taches blanches deviennent nécrotiques et leur aspect devient comme celui d'un œil d'oiseau (Figure II.7).



Figure II.7 : Taches nécrotiques au centre (Flèches noires) en œil d'oiseaux sur fruits de tomate induites par l'application de l'isolat CmmJS07 (18 jours après l'infection).

Le nombre des taches par fruit ainsi que le pourcentage des fruits avec des taches sont déterminés après 4 semaines de l'infestation des fruits (Tableau II.2). Des différences significatives sont notées entre les isolats en termes de nombre de taches par fruit et de pourcentage de fruits avec des taches nécrotiques. Le nombre moyen de taches par fruit varie de 22 à 225 taches. Le plus grand nombre de taches est obtenu avec les isolats CmmJS07 et CmmH195. En outre, ces deux isolats ont induit des taches nécrotiques sur 100% et 71% des fruits traités, respectivement, alors que le pourcentage des fruits avec ces taches n'a pas dépassé 48,5% dans le cas des deux autres isolats (Tableau II.2).

Tableau II.2 : Capacité de 4 isolats de *C. m. subsp. michiganensis* à produire des taches nécrotiques sur fruits de tomate

	CmmJS07	CmmH195	CmmJS05	Cmm1
% des fruits avec taches	100 a	71 b	48.5b	32.5b
Nombre de taches/fruit	225 a	52.5b	37 b	22 b

Les nombres moyens de taches par fruit sont analysés statistiquement avec l'analyse de variance (ANOVA) en utilisant le test de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). La différence entre les traitements est déterminée par la méthode de Dunn.

2.4- Test de flétrissement des plantules

L'apport d'une suspension cellulaire (10^8 ufc ml^{-1}) de l'agent pathogène sur les racines par trempage a donné initialement un faible pourcentage d'infection pour tous les isolats testés. En fait, ce pourcentage ne dépasse pas 50% après un mois. La vitesse d'apparition des symptômes, à savoir le flétrissement unilatéral des feuilles suivi par le flétrissement généralisé, varie d'un isolat à un autre. 20 jours après l'inoculation, on note un pourcentage de flétrissement unilatéral de 0 ; 0 ; 13,33 et 6,66% des plants inoculés respectivement par les isolats CmmJS05, Cmm1, CmmJS07 et CmmH195. Il importe de souligner qu'après quarante jours, ces pourcentages respectifs, relativement modérés, atteignent des niveaux supérieurs, soient 26,66 ; 20 ; 60 et 33,33% (Figure II.8). Parallèlement, on observe le caractère de plus en plus généralisé de ce flétrissement (Figure II.9). L'isolat CmmJS07 se montre le plus virulent suivi par l'isolat de référence CmmH195.

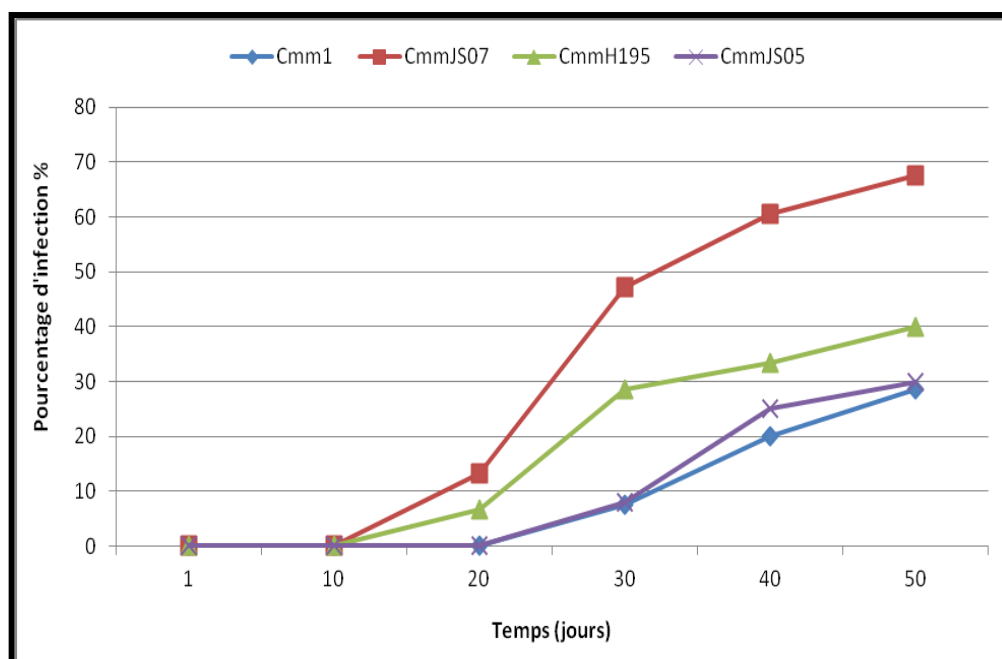


Figure II.8 : Flétrissement des plantes dont les racines ont été infectées par pulvérisation des suspensions (10^8 ufc ml^{-1}) des isolats testés du pathogène.



Figure II.9 : Flétrissement des plantules après inoculation des racines avec une suspension de l'isolat CmmJS07 et de l'isolat de référence CmmH195.

Le tableau III.3 qui va suivre récapitule les résultats obtenus avec les quatre tests. Il paraît très nettement que l'isolat le plus virulent est bel est bien CmmJS07 puisqu'il affiche la capacité la plus élevée d'induire les symptômes du chancre bactérie de la tomate. C'est cet isolat qui sera donc retenu pour les études *in vivo* qui vont suivre. On doit noter néanmoins que lors des tests du screening *in vitro* (à la base de l'antibiose en boîte) nous avons utilisé la souche de référence CmmH195. Et ceci pour la simple et la bonne raison que ces tests ont été entrepris bien avant l'isolement de nos isolats pathogènes. La souche de référence était le seul pathogène disponible au laboratoire.

Tableau II.3 : Evaluation du pouvoir pathogène de quatre isolats de *C. m. subsp. michiganensis*, selon quatre tests différents

	CmmJS07	CmmH195	CmmJS05	Cmm1
Hypersensibilité sur Tabac	100%	100%	65%	85%
Dessèchement des cotylédons	100%	100%	30%	65%
Flétrissement des plantes de tomate	60%	33,33%	26,66%	20%
Induction des taches en œil d'oiseaux	100%	71%	48,5%	32,5%

IV- Discussion et conclusion

Le chancre bactérien de la tomate est une maladie grave qui sévit dans le monde entier. Les pertes économiques qui lui sont liées sont considérables et peuvent même atteindre 100% de la production dans les conditions favorables (Hausbeck *et al.* 2000).

Les résultats obtenus lors de nos investigations confirment la présence significative du chancre bactérien dans la région, puisque dix exploitations sur 13 ont été positives pour Cmm. Cette fréquence élevée peut être partiellement expliquée par l'intensité de la culture de la tomate dans la région et par les conditions climatiques favorables au développement de cette bactérie pathogène. La température de 25 à 30°C qui est convenable à la culture de la tomate constitue également la température optimale de *C. m. subsp. michiganensis*. Toutefois, la dissémination aussi importante de cet agent dans la région ne peut avoir lieu que si l'inoculum provient d'une source largement utilisée ou à propagation simple ; comme cela est fort probable dans le cas des semences ou des débris contaminés des cultures antérieures. En réalité, lors des prospections menées, nous avons constaté que le pathogène est constamment présent dans les exploitations de tomate de variété «hybrides Long Shelf Life»; ce qui suggère fortement la possibilité d'une contamination par semences. Ceci concorde bien avec l'affirmation de Boudyach *et al.* 2004, selon laquelle l'introduction des hybrides dits "Long Shelf Life" et le choix de la culture intensive de tomate sont les principales causes d'apparition des problèmes phytosanitaires, dont le chancre bactérien, dans la région du Souss Massa Draa. Durant nos prospections nous avons remarqué qu'une fois déclaré en un point donné au sein d'une serre, le chancre fait tâche d'huile en induisant l'apparition de foyers (plusieurs lignes de plants attaqués) en fonction de la direction suivie au cours de l'intervention sur les pieds de tomate. Ceci peut s'expliquer par les observations de Chang *et al.* 1992 et 1993 d'après lesquelles ; l'attaque intense par cet agent peut se manifester par des

chancres ouverts remplis d'exsudats bactériens qui apparaissent sur les tiges des plantes. Ces populations épiphytes constituent la source de l'inoculum bactérien qui sera largement disséminé. Les stomates des feuilles servent en effet de porte d'entrée pour le pathogène (Carlton *et al.* 1998) qui sera de plus en plus répandu.

Le screening des isolats de l'agent pathogène a montré que le degré de virulence varie d'un isolat à l'autre ; certains isolats sont nettement plus agressifs que d'autres. Notons tout de même que tous les isolats ont développé des réactions HS sur les feuilles de Tabac confirmant ainsi leur pouvoir pathogène. On doit signaler toutefois que les isolats CmmJS05 et Cmm1 n'ont développé une réaction HS que pour 65% et 85% des sites infiltrés respectivement. Alors que les deux isolats CmmJS07 et CmmH195 ont développé des réactions HS dans 100% des cas. de Pinto et ses collaborateurs (2003) rapportent que le développement d'une réaction HS sur feuilles de tabac est étroitement lié à la synthèse de certains exo polysaccharides (EPSs) par les pathogènes. Ces molécules sont en effet les déterminants de leur virulence. Elles agissent pour contrecarrer les mécanismes de défenses des plantes. Plusieurs EPSs réduisent la production de la phénylalanine ammonia lyase (PAL), l'enzyme marqueur de la réponse des plantes au stress (de Pinto *et al.* 2003). En plus, ces EPSs peuvent aussi altérer le métabolisme de l'ascorbate, un autre paramètre indicatif des conditions de stress et dont l'implication dans l'établissement des réactions HS est évoquée par de Pinto *et al.* 2003. La différence de virulence remarquée ici pour les quatre isolats de *Clavibacter* peut donc être expliquée par la variabilité de ces isolats en termes de qualité et quantité des EPSs synthétisés. Plusieurs travaux de recherche discutent le fait que ces molécules peuvent être considérer comme un signal qui détermine aussi bien l'interaction plante/pathogène que le degré de virulence d'un pathogène donné. Dans leur synthèse, Olczak-Woltman *et al.* (2009) ont étudié le couple plante/pathogène composé de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Smith et Bryan) comme pathogène et le concombre (*Cucumis sativus* L.) comme plante hôte. Ils rapportent qu'ils y'a des facteurs spécifiques (toxines, enzymes...etc) produits au cours de la pathogénèse. Ces mêmes facteurs sont impliqués dans la réaction d'hypersensibilité sur feuilles de tabac. Ces facteurs diffèrent d'un pathovars à l'autre et peuvent induire différents types de résistance au niveau de la plante du concombre ; à savoir la résistance systémique acquise (RSA) ou la résistance systémique induite (RSI). Si on analyse nos résultats de la même manière on peut conclure que les isolats de *Clavibacter* étudiés ici synthétisent des facteurs de pathogénie différents et constituent donc des pathovars distincts. On doit toutefois être prudents en tirant cette conclusion. En effet, Ge *et al.* (2012) rapportent que les différences de virulence n'ont pas justifié le

regroupement des isolats de *S. sclerotiorum* dans des pathotypes (pathovars) distincts selon plusieurs études. Peut-être une raison pour une telle conclusion était les observations de Melzer et Boland (1996) suite à leur travail sur la laitue et Morrall *et al.* (1972) en travaillant sur 23 hôtes différents. Ces deux groupes de chercheurs ont défini ce qui équivalait à un "continuum" de la virulence au sein des isolats de ce pathogène. En outre, même si des différences significatives en termes de virulence parmi les isolats sont observées, leurs réponses étaient chevauchantes.

Par rapport au dessèchement des cotylédons, il est survenu le premier jour pour l'isolat CmmJS07 et a atteint un pourcentage de 100% des plants après quatre jours de l'inoculation. Le même schéma est observé pour l'isolat CmmH195, sauf que le dessèchement n'est signalé qu'après 48h et atteint 50% des cotylédons desséchés à ce moment. Les deux autres isolats sont, selon ce test, moins virulents puisque le pourcentage des cotylédons desséchés est de seulement 30% et 65% pour CmmJS05 et Cmm1 respectivement après quatre jours de l'inoculation. Les premiers cotylédons desséchés sont apparus après 48h avec un pourcentage de dessèchement de 15% et 25% pour CmmJ05 et Cmm1 respectivement.

Selon Chaldecott et Preece 1983, la vitesse et la sévérité d'apparition des symptômes lors du test des cotylédons sont liées à la virulence de l'isolat pathogène testé ainsi qu'à la concentration de la suspension utilisée et au degré d'humidité. En réalité, le test des cotylédons permet non seulement de classer les isolats du pathogène selon leurs degrés de virulence mais aussi de différencier *Clavibacter* des autres corynobactéries Gram positif isolées de la rhizosphère de la tomate. Les résultats relatifs au test des cotylédons suggèrent fortement que tous les isolats testés sont bien *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ; conformément aux travaux de Chaldecott et Preece 1983. Par ailleurs, l'isolat CmmJS07 s'avère être l'isolat le plus virulent.

En ce qui concerne l'apparition des taches en œil d'oiseaux sur les fruits, CmmJS07 constitue, une fois de plus, l'isolat le plus virulent du fait qu'il induit le plus grand nombre de taches par fruit (225) et le pourcentage le plus élevé de fruits avec taches (100%). Ce pourcentage maximum fut obtenu à la concentration de 10^8 UFC ml⁻¹. Le développement intense de ce symptôme, dit tardif, du chancre bactérien sur de jeunes fruits de tomate confirme bien la pénétration de la bactérie pathogène via les portes naturelles qui ne sont autres que les stomates des fruits et des ovaires (Getz *et al.* 1983). Ces résultats s'accordent bien par rapport à l'identité de nos isolats comme étant bel et bien *Clavibacter michiganensis*

subsp. *michiganensis*. D'après les résultats de Medina-Mora *et al.* 2001, le développement des taches en œil d'oiseaux sur les fruits dont la surface a été traitée par des suspensions de *Clavibacter* est observé même dans le cas des isolats négatifs pour le test d'HS. Ce qui amène à penser que les mécanismes exacts de pathogénicité sont encore mal connus dans le pathosystème (*Clavibacter* / Tomate). Toutefois, le nombre des taches par fruits ainsi que le pourcentage des fruits présentant des taches sont constamment plus élevés dans les cas des isolats virulents et intermédiaires (Medina-Mora *et al.* 2001). Ceci concorde avec nos résultats puisque les isolats CmmJS05 et Cmm1 décrits comme étant les moins virulents engendrent seulement une moyenne de 37 et 22 taches par fruit respectivement. Le pourcentage des fruits avec taches est aussi médiocre il est de l'ordre de 48,5% et 32,5% pour ces deux isolats. Ce pourcentage atteint 71% et 100% pour les isolats CmmH195 et CmmJS07 respectivement et qui sont jugés plus virulents.

Lors du test de flétrissement des plantes, nous avons apporté le pathogène par inoculation des racines de jeunes plantules avec une suspension à la concentration de 10^8 ufc ml^{-1} . Les résultats obtenus montrent que l'apparition des symptômes, à savoir le flétrissement unilatéral des feuilles puis des plantes suivis par le flétrissement généralisé, est survenu avec une vitesse qui varie d'un isolat à un autre. Cependant, D'après ces résultats, l'isolat CmmJS07 est retenu comme étant l'isolat le plus virulent suivi par l'isolat de référence CmmH195. En réalité, les résultats obtenus par plusieurs équipes de recherche ont montré que le degré de virulence des pathogènes des plantes varie selon la concentration de l'inoculum, l'âge de la plante ainsi que la méthode d'inoculation (Chang *et al.* 1992 ; Boudyach *et al.* 2004). Toutefois, la confrontation de l'ensemble des résultats obtenus après réalisation des quatre tests précités démontre clairement que l'isolat CmmJS07 est doué d'un pouvoir pathogène remarquable (Tableau II.3).

En guise de conclusion, on peut dire que le chancre bactérien est une maladie qui reste un fléau pour la culture de la tomate dans la région concernée par cette étude à savoir l'axe Ait Melloul-Biougra. Le pourcentage des échantillons positifs pour *Clavibacter* dépasse 76%. Les variétés cultivées dans cette région durant nos investigations sont principalement des variétés sensibles au pathogène et dont les semences sont importées. On peut donc suspecter que ce sont ces semences qui hébergent l'agent pathogène et qui sont responsables de l'intense étendue de cette bactériose. La globalisation et l'évolution du commerce des semences hybrides à travers le monde ne fait qu'aggraver la situation épidémiologique. L'étude de la virulence des isolats collectés lors de cette étude montre une variabilité

significative par rapport à ce caractère. Néanmoins, CmmJS07 apparaît être le plus virulent des isolats étudiés. L'apparition des symptômes est plus rapide avec le test des cotylédons (après 4 jours) suivie de l'infection des racines (après 6 jours) puis de l'infection de la surface des fruits (après 10 jours).

En perspectives, il serait intéressant d'approfondir la caractérisation des isolats de *C. m.* subsp. *michiganensis*, recueillis lors de cette étude, par des études moléculaires qui reposeront sur l'utilisation de marqueur tels que les ISSR (Inter Simple Sequence repeat) (Baysal *et al.* 2011) ou sur l'étude du polymorphisme des gènes spécifiques tel que l'ARN 16S, pat-1 ou celA (Kleitman *et al.* 2008 ; Zaluga *et al.* 2013). L'objectif de telles études est la réalisation d'une cartographie génétique de l'agent pathogène dans notre région. Cette cartographie pourrait constituer un outil précieux pour concevoir un contrôle plus efficace de la maladie au sein de notre région d'une part, et permettrait sans doute le suivi du flux des nouvelles sources d'inoculum d'autre part (Baysal *et al.* 2011). Un autre axe de recherche peut être envisagé, il concerne l'étude approfondie des interactions qui régissent le couple *Clavibacter*/tomate dans le but de bien élucider les mécanismes de la pathogénie ainsi que ceux impliqués dans une éventuelle résistance de la plante hôte. On trouve en effet dans la littérature plusieurs écrits dédiés à cette thématique avec d'autres pathosystèmes (Li *et al.* 2010...etc). L'exploitation des résultats obtenus pourrait aboutir à un contrôle optimisé du pathogène.

CHAPITRE III

Isolement, sélection et évaluation de
l'efficacité des *Pseudomonas* spp. fluorescents
antagonistes *in vivo*

I- INTRODUCTION

Actuellement, les traitements phytosanitaires à base de produits chimiques suscitent une méfiance de plus en plus grande (Lugtenberg *et al.* 1991) du fait de leurs impacts aussi bien sur l'environnement que sur la santé des consommateurs. La lutte biologique par introduction des microorganismes antagonistes s'avère une voie très prometteuse dans le contrôle de plusieurs maladies de plantes en culture et en post récolte (Bouzerda *et al.* 2003 ; Mercado-Blanco *et al.* 2004 ; Boudyach, 2004 ; Taqarort *et al.* 2008 ; Bardas *et al.* 2009 ; Abo-Elyousr *et al.* 2009 ; Liu *et al.*, 2009; Gandhi et Saravanakumar, 2009 ; Validov *et al.* 2005, 2007 et 2009 ; Amkraz *et al.* 2010 ; Anitha et Arun Das. 2011 ; Andrés *et al.* 2011 ; Talibi *et al.* 2011, Vargas *et al.* 2010). Cette alternative ne présente pas de risques notables sur la santé des consommateurs ou sur l'environnement.

Selon plusieurs spécialistes de la lutte biologique, la recherche et l'isolement des microorganismes, agents potentiels de contrôle biologique des pathogènes des plantes doit se faire à partir des racines des plantes à protéger qui poussent sur un sol infecté par le ou les pathogènes en question (Cook, 1993; Boudyach, 2004). Ceci est dicté par le souci d'avoir un candidat compétitif et bien adapté à l'environnement tellurique créé et géré par les interactions des racines de la plante hôte et de l'agent pathogène à combattre. Un autre aspect doit être respecté lors de l'isolement de ce type de micro-organisme, c'est le choix de racines des plantes vigoureuses et saines dans un foyer de la maladie à contrôler. Ainsi, Les microorganismes qui vivent dans la zone entourant les racines, à leur surface voire même à l'intérieur des tissus racinaires, constitueraient donc un réservoir très riche duquel on peut isoler des candidats potentiels de lutte biologique. Ces microorganismes sont appelés rhizobactéries. Kaymak (2011), dans sa revue, évoque que les rhizobactéries favorisant la croissance végétale (PGPR) constituent un groupe de bactéries libres qui colonisent la rhizosphère et influencent la croissance des racines des plantes. Des bactéries appartenant à des genres aussi divers qu'*Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* (Selvakumar *et al.* 2009 et 2011) etc, ont été identifiés comme PGPR. Ces PGPR exercent un effet direct sur la croissance des plantes par :

- L'induction de la production de phytohormones,
- L'apport de l'azote fixé biologiquement,
- L'augmentation de l'absorption du phosphore par la solubilisation des phosphates inorganiques (Tripathi *et al.* 2011).

Ces bactéries PGPR affectent également la croissance des plantes par des mécanismes indirects impliquant la suppression des pathogènes bactériens, fongiques, viraux ainsi que des nématodes. Plusieurs études (Kaymak 2011, Maheshwari *et al.* 2012) ont montré que l'inoculation avec des PGPR entraîne :

- L'induction d'une floraison précoce,
- L'enracinement des boutures ligneuses,
- L'amélioration de la germination et l'accroissement de l'émergence des semences dans des différentes conditions,
- L'amélioration de l'absorption des nutriments par les racines,
- L'augmentation du poids des graines,
- L'augmentation de la biomasse totale des plantes,
- Une augmentation significative des rendements de différentes cultures.

Il est à noter aussi que l'effet bénéfique des rhizobactéries est directement lié à leur interaction avec les différents constituants de la rhizosphère. Ceci justifie l'intérêt de tester leur pouvoir colonisateur des racines de la plante à protéger (Rosas *et al.* 2009). Le fait que les *Pseudomonas* spp. fluorescents soient d'excellents colonisateurs se traduit par leur densité élevée dans la rhizosphère mais ce phénomène découle aussi directement de leur aptitude à cataboliser les constituants des exsudats racinaires. La persistance des *Pseudomonas* spp. fluorescents agents de contrôle biologique au niveau du sol après leur introduction comme inoculant est largement étudiée par de nombreux auteurs. C'est ainsi que Troxler *et al.* 2012 ont prouvé que ce groupe de bactérie antagonistes est capable de se maintenir avec une population assez importante et à une profondeur allant jusqu'à 200 cm.

L'étude de la colonisation nécessite de procéder au marquage pour suivre les souches introduites. Plusieurs techniques de marquage ont été citées dans la littérature mais la plus ancienne et la plus utilisée, jusqu'à l'heure actuelle, reste le marquage avec la résistance aux antibiotiques. En effet, des mutants résistants à un ou plusieurs antibiotiques ont été utilisés par plusieurs auteurs ; Kloepper *et al.* 1980 utilisent des mutants doublement résistants à la rifampicine et à l'acide nalidixique pour étudier leur capacité de colonisation des racines des plants de pomme de terre. Boudyach *et al.* (2004) utilisent des mutants résistants, de deux *Pseudomonas* spp. fluorescents, vis-à-vis de trois antibiotiques à savoir, l'ampicilline, le chloramphénicol et l'acide nalidixique pour étudier leur capacité à coloniser les racines des plants de tomate. Bref, différentes combinaisons d'antibiotiques sont utilisées par les auteurs pour marquer les isolats bactériens à étudier (Geels et Schippers, 1983 ; Compeau *et al.*, 1988 ;

Liu *et al*, 1995...etc). Le choix des antibiotiques de marquage tient compte généralement du support génétique de leur résistance chez les bactéries (génomique ou plasmidique) (Boudyach, 2004). Il est toujours souhaitable que la résistance soit génomique pour garantir la stabilité du marquage et prévenir le transfert horizontal de la mutation parmi les rhizobactéries indigènes (Glandorf *et al*. 1992).

Les rhizobactéries sélectionnées, à base de leur pouvoir antagoniste et colonisateur, peuvent être réintroduites dans leur milieu, dans le but de contrôler la maladie cible. La réussite de cette réintroduction est présumée garantie du fait qu'ils sont des résidents de cet environnement et qu'ils y sont très adaptés.

Dans cette partie de notre travail, nous allons aborder les volets suivants :

- L'isolement des *Pseudomonas* spp. fluorescents à partir du rhizoplan, du sol rhizosphérique et de l'endorhizosphère des plantules de tomate saines situées dans un foyer de chancre bactérien ;
- Le screening *in vitro* des *Pseudomonas* isolés sur la base de leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis du pathogène.
- Le screening des isolats *Pseudomonas* spp. fluorescents inhibiteurs sur la base de leur pouvoir de colonisation racinaire.
- Le screening des *Pseudomonas* spp. fluorescents inhibiteurs sur la base du test de dessèchement des cotylédons.
- L'évaluation de l'efficacité des meilleurs isolats antagonistes sélectionnés pour le contrôle du chancre bactérien de la tomate *in vivo*. Cette évaluation est faite à deux niveaux :
 - ✓ En pots sous serre,
 - ✓ Dans les conditions de production de la tomate.

II- MATERIEL ET METHODES

1- Isolement des *Pseudomonas* spp. fluorescents et de la flore rhizosphérique totale

1.1- Prospection et prélèvements des échantillons

De nombreuses sorties de prospection ont été réalisées dans la région du Souss-Massa Draa au cours des années 1998, 1999 et 2000. Plusieurs exploitations de production de la tomate aussi bien sous serre qu'en plein champ ont été visitées dans l'axe Ait Melloul-Biougra. Des échantillons ont été prélevés à partir des plants sains situés au centre d'un foyer de chancre bactérien (plantes avec les symptômes caractéristiques du chancre à savoir : le

flétrissement unilatéral des feuilles, le brunissement de leurs bordures et éventuellement le brunissement des tissus conducteurs). Des échantillons de sol et de racines ont été prélevés, autour du système racinaire des plantes vigoureuses, à l'aide d'une pelle et d'un cylindre de 10 cm de diamètre et de 20 cm de longueur. Chaque échantillon est constitué d'au moins quatre plantes saines de la même exploitation. Le matériel biologique prélevé est mis sous plastique et étiqueté. Toutes les informations relatives à l'échantillonnage sont enregistrées, à savoir: la localité, la variété de la tomate, le type de culture (sous serre ou plein champ), les traitements chimiques utilisés, le précédent cultural, la nature du sol et la date du prélèvement. Les isollements sont réalisés, souvent le même jour, au laboratoire LBVRN. Dans le cas échéant, les échantillons sont conservés au réfrigérateur (4 à 5°C) et sont analysés en moins de 24h.

1.2- Analyse des échantillons

Les isollements des *Pseudomonas* spp. fluorescents et de la flore bactérienne totale sont réalisés à trois niveaux comme défini par Dommergues et Mangenot (1970), à savoir :

- Le sol rhizosphérique au sens strict (SR): qui est représenté par le sol étroitement lié aux racines (récupéré par agitation énergétique).
- Le rhizoplan (RH) qui correspond à l'eau de lavage des racines débarrassées du SR.
- L'endorhizosphère (ER) qui correspond aux broyats des racines lavées, c'est-à-dire débarrassées du RH.

a- Isolement à partir du SR

Après homogénéisation de l'échantillon du sol par broyage, 0,5 g du sol sont placés dans un Erlen Meyer contenant 4,5 ml d'eau physiologique stérile (NaCl 0,85 %, EPS). Après agitation à 120 rpm pendant 2 mn et décantation, on réalise une série de dilutions décimales jusqu'à 10^{-6} . Pour l'isolement et le dénombrement de la flore bactérienne totale, un aliquot de 0,1 ml des dilutions 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} est étalé sur milieu de culture gélosé NBY (Annexe 1) en boîte de Pétri additionné de cycloheximide ($100 \mu\text{g.ml}^{-1}$) (Schaad, 1988). Par rapport aux *Pseudomonas* spp. fluorescents (PF), leur isolement et leur dénombrement sont réalisés en étalant 0,1 ml des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} sur le milieu de culture sélectif King B (KB) (King *et al.*, 1954) (Annexe 1). Ces bactéries apparaissent fluorescentes sur ce milieu sous UV à 365 nm avec une fluorescence qui varie du bleu vers le jaune verdâtre selon l'espèce bactérienne.

b- Isolement à partir du RH

Le système racinaire (racines principales et secondaires) débarrassé du SR est coupé en morceaux d'environ 2 à 3 cm. Un gramme de ces fragments racinaires est placé dans une fiole stérile de 100 ml contenant 10 ml d'EPS. Puis soumis à une agitation dans un bain-marie à température ambiante pendant 2 h. Les racines sont ensuite enlevées et une série de dilutions décimales est réalisée à partir de l'eau de lavage. Les isollements et les dénombrements sont alors effectués comme décrit précédemment sur deux milieux gélosés :

- NBY pour la flore bactérienne totale.
- KB pour les PF.

c- Isolement à partir de l'ER

Les morceaux de racines lavés et débarrassés du RH sont désinfectés par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium 2,5 % pendant 3 mn (Mew and Rosales, 1986). Après désinfection et lavage trois fois avec de l'eau distillée stérile (EDS), un gramme de morceaux de racines est macéré dans un mortier stérile avec 10 ml d'EPS. Une série de dilutions décimales est préparée à partir du broyat racinaire. Les isollements et les dénombrements sont effectués de la même manière qu'auparavant mais avec les dilutions de 10^0 , 10^{-1} et 10^{-2} pour l'ensemencement du milieu KB et de 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} pour celui de NBY (Tableau III.1). Tous les ensemencements sont répétés trois fois et les boîtes sont incubées à 26°C pendant 24 à 48 h. les résultats sont exprimés en ufc g⁻¹ du sol sec pour SR et en ufc g⁻¹ du poids des racines fraîches pour RH et ER.

Tableau III.1 : les dilutions utilisées pour chaque milieu de culture

	SR			RH			ER		
Milieu KB	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^0	10^{-1}	10^{-2}
Milieu NBY	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}

1.3- Purification et conservation des PF

Les colonies développées sur milieu KB et produisant une fluorescence jaune verdâtre sont repiquées deux fois sur le même milieu. Chaque isolat est affecté d'un code de référence puis conservé à 4°C sur le milieu YDC (Yeast Dextrose Carbonate agar) (Annexe 1) (Jiménez

et al, 2004). Pour une conservation à moyen et à long terme, les isolats sont maintenus à -80°C dans du glycérol 40% (Parke *et al*, 1986 ; Weller *et al*, 1988).

2- Sélection *in vitro* des PF antagonistes

La méthode utilisée est celle du contact direct sur milieu gélosé décrite par Boudyach (2004).

2.1- Préparation des cultures des PF

Après rajeunissement des cultures bactériennes conservées sur milieu LG (Annexe I), des suspensions sont préparées dans l'EPS puis ajustées à $\sim 10^8$ ufc.ml⁻¹. Des aliquotes de 0,1 ml de chaque suspension bactérienne sont déposés au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu gélosé NBY. Ensuite, les boîtes sont pré-incubées pendant 24 h à 26°C.

2.2- Préparation de l'inoculum de *C. m.* subsp. *michiganensis*

Lors de cette étude qui a été entreprise avant l'isolement de nos propres isolats du pathogène, on a utilisé l'isolat de référence CmmH195 de *C. m.* subsp. *michiganensis*. En fait, cet isolat a été obtenu au laboratoire de phytobactériologie du complexe horticole de l'IAV Hassan II d'Agadir à partir de plants de tomate (Boudyach *et al.* 2004). Le pouvoir pathogène de cet isolat est maintenu par passage régulier sur plante (inoculations des feuilles puis ré-isolements) (Boudyach *et al.* 2004). Une jeune culture est obtenue sur milieu gélosé NBY après incubation à 26°C pendant 48 h. A partir de cette culture, une suspension est préparée dans l'EPS et ajustée à $\sim 10^8$ ufc.ml⁻¹ (DO = 0,46 à 660 nm d'après Umesha, 2006).

2.3- Evaluation de l'antagonisme *in vitro* par contact direct

Après 24 h d'incubation, la suspension du pathogène préparée est pulvérisée sur les boîtes contenant les isolats de *P. spp.* fluorescents au centre. Après une ré-incubation à 26°C pendant 24 à 48 h, on mesure les diamètres des zones inhibition (ZI).

2.4- Sélection, purification et conservation des antagonistes potentiels

Les isolats bactériens qui ont donné des zones d'inhibition (ZI) supérieures ou égales à 2 mm sont sélectionnés. Les antagonistes sont classés selon le diamètre des ZI en groupes aléatoires. La pureté des isolats retenus est examinée par observation microscopique des frottis colorés (Gram et Bleu de méthyle). Tous les isolats antagonistes purifiés sont conservés comme décrit précédemment.

3- Evaluation de la colonisation racinaire par les antagonistes sélectionnés

3.1- Préparation des mutants résistants aux antibiotiques

L'étude de la colonisation des racines de plantes dans un substrat non stérile nécessite l'utilisation de bactéries marquées pour faciliter leur suivi et leur ré-isolement. Le marquage des bactéries par la résistance spontanée aux antibiotiques est une technique très utilisée par les chercheurs en microbiologie du sol. C'est dans ce cadre que des mutants spontanés résistants aux antibiotiques sont préparées à partir des meilleurs (42) isolats antagonistes retenus lors du screening à base de l'antibiose *in vitro* (Tableau III.2).

La méthode décrite par Kloepper *et al.* 1980 est adoptée, avec quelques modifications, pour le marquage des isolats avec la résistance aux antibiotiques. Chaque isolat est soumis à des repiquages successifs sur le milieu KB additionné des quatre antibiotiques de marquage suivants:

- La rifampicine à 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$;
- L'acide nalidixique à 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$;
- L'ampicilline à 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ et
- Le chloramphénicol à 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Pour prévenir les contaminations par les champignons, le milieu de culture est additionné de cycloheximide à 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Juste après l'autoclavage du milieu de culture KB, les antibiotiques et l'antifongique stérilisés par filtration y sont ajoutés pour avoir les concentrations requises précitées. Le milieu de culture, ainsi préparé, a été par la suite distribué dans des boîtes de Pétri. Après solidification, le milieu de culture est ensemencé à raison de trois boîtes par antagoniste. Par la suite, les boîtes sont incubées à 26°C pendant 24 à 48h. Les colonies qui poussent sont repiquées, trois fois successives, sur le même milieu avant d'être conservées au glycérol 40% à -25°C. Il faut noter que la stabilité de l'activité antagoniste des mutants est testée après marquage par la résistance aux antibiotiques.

3.2- Préparation et bactérisation des semences

Les semences de tomate (cv. Clause 27, France) sont désinfectées par trempage pendant 3 min dans une solution d'hypochlorite de sodium 2,5% (Mew and Rosales, 1986). Les semences, ainsi désinfectées, sont lavées à l'eau du robinet pour enlever toute trace d'hypochlorite de sodium. Elles sont ensuite séchées à température ambiante au laboratoire pendant 12 h. Des suspensions des 42 isolats antagonistes marquées par la résistance aux antibiotiques sont préparées, à partir de jeunes cultures de 24 h, dans l'EDS et additionnées du

Xanthan gum 0.5% stérile pour avoir une concentration finale de 10^8 ufc ml⁻¹ (DO = 0,5) (Boudyach *et al.* 2001). Les semences de tomate préalablement désinfectées et séchées sont ajoutées au mélange « adhésif-bactérie » à raison de 0,25 g par 10 ml de mélange. Après 30 mn d'agitation sur agitateur magnétique, les semences bactérisées sont récupérées et séchées à l'air libre durant une nuit.

3.3- Préparation du substrat et semi des graines bactérisées

Des terrines (77 alvéoles chacune) sont désinfectées à l'eau de javel 10% puis rincées abondamment à l'eau du robinet. Elles sont ensuite séchées et remplies d'un mélange sable-tourbe (1 : 2, v : v). Les semences bactérisées sont semées, à raison d'une graine par alvéole, et recouvertes d'une fine couche de substrat. Des témoins constitués de semences désinfectées et traitées uniquement au Xanthan 0,5% sont semées comme précédemment. Les terrines sont placées, par la suite, dans une serre expérimentale avec une photopériode de 12 h, une T° max de 28°C, une T° min de 10°C et une humidité relative (HR) de 80%. Elles sont arrosées chaque deux jours et fertilisées chaque semaine avec une solution nutritive commerciale (NPK 20-20-20, Poni France). Tous les traitements sont répétés 12 fois (trois blocs aléatoires de 4 répétitions chacun).

3.4- Evaluation de la colonisation des racines

Après deux semaines, stade deuxième vraie feuille, les plantules correspondant à chaque traitement sont délicatement dégagées du substrat. Les racines sont agitées afin de les débarrasser des gros débris du substrat. Chaque racine est ensuite coupée en trois fragments sensiblement égaux à l'aide d'un bistouri stérile. Les fragments de racines sont soigneusement étalés sur le milieu de culture KB⁺ (KB additionné des antibiotiques de marquage et d'un antifongique). Les boîtes sont incubées, par la suite, à 26°C durant 48 h. la colonisation des racines par les antagonistes introduits est évaluée à l'œil nu, en recherchant le développement de manchons bactériens autour des fragments racinaires, sous UV à 365 nm pour confirmer la fluorescence. Le pourcentage des plantules avec racines colonisées est aussi déterminé pour évaluer qualitativement la colonisation des racines par les antagonistes.

4- Evaluation du contrôle du chancre *in vivo*

4.1- Test des cotylédons

Ce test est utilisé pour le screening des souches de *C. m.* subsp. *michiganensis* en se basant sur l'évaluation de leur pathogénie (Chaldecott et Preece, 1983). Nous avons adopté ce test pour réaliser un screening rapide des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents

sélectionnées, basé sur la réduction de l'incidence du dessèchement des cotylédons. Le test est réalisé avec des plantules âgées de quatre jours (après la germination des semences). La tige au dessus des cotylédons de chaque plantule est coupée avec une paire de ciseaux désinfectés et préalablement trempés dans une suspension (10^8 ufc.ml⁻¹) de l'isolat pathogène Cmm JS07. Une heure après inoculation avec le pathogène, une goutte d'une suspension (10^8 ufc.ml⁻¹) de chaque isolat, des 42 isolats déjà utilisés lors du screening précédent, est déposée à la surface de la section de la tige. Des plantules inoculées avec l'EDS seulement (témoin négatif) ou avec le pathogène seul (témoin positif) sont également préparées. Les traitements sont répétés quatre fois et l'expérience trois fois. Les signes du dessèchement des cotylédons sont recherchés durant quatre semaines. Ensuite, on réalise une estimation de l'incidence du dessèchement (ID) et on estime le pourcentage de réduction (RD) de ce dessèchement pour chaque isolat par rapport au témoin et ce en utilisant les formules suivantes :

$$\text{ID (\%)} = (\text{nombre des cotylédons desséchés} / \text{nombre total des cotylédons}) \times 100$$

$$\text{RD (\%)} = [(\text{ID témoin} - \text{ID traitement}) / \text{ID témoin}] \times 100$$

4.2- Contrôle du chancre en pots sous serre

La méthode décrite par Boudyach *et al.* (2001) modifiée a été adoptée. Des semences de tomate de la variété sensible Daniella (Espagne) ont été bactérisées comme décrit précédemment avec les huit isolats (RN58, RN63, RN69, RN42b, RN53b, RN130, RN47e et RN39e) retenus lors du test des cotylédons. Les semences bactérisées sont semées dans des terrines alvéolées désinfectées et remplies d'un mélange de tourbe et de sable (2 : 1 / v : v) à raison d'une semence par alvéole. Des semences non bactérisées sont utilisées comme témoins. Les essais ont été menés dans une serre expérimentale, au complexe horticole de l'IAV Hassan II Aït Melloul, avec une photopériode de 12h, une température minimale de 10°C, une température maximale de 28°C et une HR de 80%. Les plantules sont arrosées chaque deux jours et fertilisées une fois par semaine avec la solution commerciale Poni NPK (20-20-20, Poni, France).

L'inoculation du substrat avec le pathogène est réalisée avec une suspension (10^8 ufc ml⁻¹) de *C. m. subsp. michiganensis* (isolat JS07). Cette suspension préparée à partir d'une jeune culture sur milieu NBY est mélangée avec le substrat (mélange de sable fin de la région du Souss-Massa Draa et la tourbe fine dans les proportions (1 : 2 / v : v). La concentration de Cmm est d'environ 10^8 ufc.g⁻¹ du sol. Le substrat, ainsi préparé, est distribué dans des pots en

plastique à raison de (4 l / pot) et couvert d'une couche de cinq centimètres de substrat non infecté. Les plantules issues des semences bactérisées, au stade 3^{ème} vraie feuille, sont délicatement retirées des terrines et transplantées dans les pots préalablement préparés (une plantule par pot). Seules les racines sont en contact avec le substrat infecté. Juste avant la transplantation, les racines sont trempées pendant trois min dans la suspension (10^8 ufc.ml⁻¹) du même isolat antagoniste utilisé pour la bactérisation des semences (renforcement de la bactérisation). Tous les traitements sont répétés dix fois et l'expérience est répétée quatre fois. Dans le but de minimiser l'effet de l'environnement, les pots sont placés en quatre blocs aléatoires. Le suivi de l'apparition des symptômes dure 12 semaines. L'estimation de l'incidence de la maladie (IM) ainsi que de la réduction de cette incidence (RI) par les traitements est faite en calculant le pourcentage des plants avec symptômes dans chaque répétition dans chaque bloc et de chaque traitement en adoptant les formules suivantes :

$$\text{IM (\%)} = (\text{nombre de plants avec symptôme} / \text{nombre total de plants}) \times 100$$

$$\text{RI (\%)} = [(\text{IM témoin} - \text{IM traitement}) / \text{IM témoin}] \times 100$$

Chaque plant montrant les symptômes du chancre bactérien a fait l'objet d'un ré-isolément de l'agent pathogène sur le milieu SCM (Fatmi et Schaad, 1988).

4.3- Contrôle du chancre dans les conditions de production de la tomate

4.3.1- Bactéries utilisées

Deux isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents sont utilisés lors de cette étude à savoir RN 39e et RN 69. Ces deux isolats présentent une action inhibitrice significative vis-à-vis de l'agent du chancre bactérien de la tomate aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (en pots sous serre). L'isolat Cmm JS07 est utilisé comme agent pathogène. Tous ces isolats appartiennent à la collection bactérienne, conservée au glycérol à -25°C, du LBVRN de la faculté des Sciences d'Agadir, Maroc.

Avant leur utilisation, les isolats bactériens sont rajeunis dans un bouillon KB (King *et al.* 1954) pour les *Pseudomonas* spp. fluorescents et dans le bouillon NBY pour le pathogène avant d'être cultivés sur les milieux gélosés (KB ou NBY). Les jeunes colonies bien individualisées (24h) ont servi à la préparation des suspensions bactériennes (10^8 ufc.ml⁻¹).

4.3.2- Production de semences de tomate contaminées par *C. m.* subsp. *michiganensis* et inoculation de la serre d'essai

Le but de cette étape est l'obtention de semences contaminées et l'inoculation du sol de la parcelle d'essai avec les débris provenant d'une culture de tomate artificiellement infectée par le pathogène responsable du chancre bactérien. Cet essai a été réalisé à la ferme El Baraka à Tifnité au sud d'Agadir. Une serre dont la superficie est d'environ 500 m² a été réservée pour cet essai (Figure III.1).



Figure III.1 : Serre utilisée pour la réalisation du test *in vivo* avec les deux meilleurs isolats RN69 et RN 39e.

Au préalable, le sol de la parcelle a été préparé pour la plantation de la tomate. Des plantules de tomate, var. Assala, sont transplantées dans la serre. Les trous de transplantation sont infectés avec 100 ml d'une suspension (10^8 ufc.ml⁻¹) du pathogène préparée comme décrit précédemment et ce juste avant la transplantation. Au stade 4^{ème} bouquet, on renforce l'infection des plants par injection de 100 µl de la suspension du pathogène, à la même concentration, à l'aisselle des feuilles et des pédoncules floraux. Après cinq mois du début de l'essai, les flétrissements unilatéraux apparaissent avec quelques fruits qui portent des taches blanchâtres. Un mois après, les symptômes du chancre deviennent bien visibles. En effet, on observe un flétrissement généralisé, un brunissement des tissus vasculaires, des chancres ouverts sur les tiges et des taches en œil d'oiseaux sur les fruits (Figure III.2). A ce stade, les plants sont privés d'eau et laissés dessécher. Après récupération des fruits, on procède à l'inoculation du sol par labour de la parcelle et enfouissement des débris des plantes infectées.

par *C. m. subsp. michiganensis*. Il est important de noter que l'agent pathogène a été ré isolé aussi bien à partir des débris de plantes qu'à partir des graines issues des fruits.



Figure III.2 : Les symptômes du chancre bactérien de la tomate. A : Flétrissement unilatéral d'un plant. B et C : Flétrissement généralisé de toute la plante. D : Brunissement et nécroses des bordures des feuilles. E : Chancres sur tiges. F : Brunissement des tissus vasculaires. G : petites taches blanches en œil d'oiseau sur fruit. (Photos prises par l'équipe de phytopathologie et lutte Intégré, Faculté des sciences Agadir lors de ce travail).

4.3.3- Bactérisation des semences par les antagonistes

Des semences de tomate var. Daniella (Espagne) sont mises dans des erlenmeyer contenant les suspensions bactériennes mélangées avec un adhésif (méthylcellulose 20%) (v:v). Les préparations sont placées sous agitation pendant 2h puis séchées sous une hotte à flux laminaire pendant une nuit. Trois traitements différents sont utilisés :

- Semences bactérisées avec l'isolat RN 39e ;
- Semences bactérisées avec l'isolat RN 69 ;
- Semences bactérisées avec une mixture (v/v) des deux isolats.

4.3.4- Semis des graines et conditions de culture

Les graines correspondant à chaque traitement sont semées dans des terrines alvéolées soigneusement lavées et désinfectées à l'eau de Javel (solution commerciale 12%) puis remplies avec un mélange sable- tourbe (1/2 : v /v). Les terrines sont étiquetées et placées dans une chambre de culture à conditions contrôlées avec arrosage tous les deux jours et fertilisation, avec la suspension commerciale Poni NPK (20 : 20 : 20, France), une fois par semaine. Le témoin comporte des graines non bactérisées qui sont semées dans les mêmes conditions. Au stade deuxième vraie feuille, les plantules sont retirées délicatement des alvéoles et les mottes sont trempées dans les suspensions bactériennes des antagonistes (10^8 ufc.ml⁻¹) fraîchement préparées avant d'être transplantées dans la serre préalablement préparée.

4.3.5- Conduite de l'essai *in vivo*

Avant la transplantation, le système d'irrigation ainsi que le paillage plastique sont refaits. Les plantules de chaque traitement, préparées comme décrit précédemment, sont transplantées dans la serre infectée. Deux autres apports des suspensions antagonistes sont réalisés à une semaine d'intervalle après la transplantation pour renforcer la bactérisation. En effet, un volume d'environ 100 ml de chaque suspension (10^8 ufc.ml⁻¹) est versé au voisinage des racines au niveau des points de transplantation. L'unité expérimentale est constituée de quatre blocs aléatoires. Chaque bloc compte trois traitements et un témoin. Chaque traitement est répété quatre fois avec dix individus dans chaque répétition. Après 15 jours, dix plantules de chaque traitement sont prises au hasard pour évaluer les différentes variables mesurables à savoir, le diamètre au collet, le poids sec (des racines et des tiges), le poids frais des plants ainsi que leur hauteur. Après un mois, on refait les mêmes mesures avec d'autres plants. L'essai a duré trois mois. L'estimation de l'incidence de la maladie (IM) ainsi que de la

réduction de cette incidence (RI) est faite selon les mêmes formules citées auparavant. Pour confirmer l'attaque par *C. m. subsp. michiganensis*, un ré-isolement du pathogène a été fait à partir des plants avec symptômes et ce en utilisant le milieu semi sélectif SCM (Fatmi et Schaad, 1988).

5- Effet de certains facteurs abiotiques sur la croissance des isolats RN 39e et RN 69

L'objectif de cette étude est de déterminer l'effet de certains facteurs abiotiques tels que la température, le pH et la pression osmotique sur la croissance et la survie des deux isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents RN39e et RN69 sélectionnés pour la lutte biologique contre le chancre bactérien de la tomate. Les résultats de cette étude permettront de déterminer les conditions optimales pour l'application de ces antagonistes dans les systèmes naturels de production de la tomate et d'évaluer approximativement le degré d'adaptation de ces isolats aux exigences de culture de la tomate.

5.1- Préparation de l'inoculum

Pour la préparation de l'inoculum, les isolats bactériens ont été mis en culture sur milieu NBY (Schaad, 1988) en tubes inclinés. Les tubes inoculés sont incubés à 26°C pendant 24 h. La crème bactérienne a été ensuite mise en suspension dans l'EDS et la concentration est ajustée à 10^9 ufc.ml⁻¹.

5.2- Etude de l'effet de la température

L'effet des températures 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 et 65°C sur la croissance et la survie des antagonistes a été évalué. Des tubes à essai contenant 3,5 ml de bouillon nutritif ont été inoculés séparément avec chacun des deux isolats de manière à avoir une concentration finale d'environ 10^8 ufc.ml⁻¹. Ces tubes sont agités au vortex puis incubés pendant 48 h dans un incubateur sous agitation ; à la température appropriée. Le témoin est représenté par des tubes non inoculés. Six tubes ont été utilisés par isolat et par température. L'effet de la température est ensuite estimé par la mesure de la densité optique (DO) à 640 nm après 48 h d'incubation.

Pour s'assurer de la pureté et la viabilité des bactéries, des boîtes de Pétri contenant le milieu KB ont étéensemencées avec des inoculas pris de chaque tube juste avant la mesure de DO. Les boîtes sont incubées à 26°C et la croissance et la pureté sont évaluées après 48 h.

5.3- Etude de l'effet du pH

Différents milieux de cultures dont les pH varient entre 3 et 11 ont été préparés en utilisant des tampons appropriés. Les pH de ces milieux ont été vérifiés et ajustés après autoclavage et juste avant l'incubation des cultures. Les tubes inoculés sont incubés à 26°C sous agitation. La survie et la croissance des isolats bactériens ont été évaluées après 48 h par lecture de la DO à 640 nm. Le tube témoin contient le tampon au pH approprié sans inoculat. Pour s'assurer de la pureté et de la viabilité des bactéries, des ensemencements du milieu KB ont été effectués à partir de chaque tube à raison de trois boîtes par tube. Ces boîtes sont ensuite incubées à 26°C pendant 48 h.

5.4- Etude de l'effet des sels (NaCl, KCl et Na₂SO₄)

Pour évaluer la résistance osmotique des antagonistes retenus, trois sels (NaCl, KCl et Na₂SO₄) sont testés séparément aux concentrations de 2,5 ; 5 ; 7,5 et 10 % (w/v). Il faut noter que le pH du milieu est ajusté à 6,5. Les isolats antagonistes RN39e et RN69 sont mis en culture dans des tubes contenant 4,5 ml du bouillon nutritif additionné séparément par les trois sels aux concentrations précitées à raison de six tubes par isolat et par concentration. Après 48 h d'incubation à la température ambiante, la DO à 640 nm de chaque tube est mesurée. Pour s'assurer de la pureté et de la viabilité des bactéries, des ensemencements du milieu KB ont été effectués à partir de chaque tube à raison de trois boîtes par tube. Les boîtes sont ensuite incubées à 26°C pendant 48 h.

6- Analyses statistiques

Les données de la colonisation sont analysées avec le test de Newman et Keuls après la transformation des pourcentages en khi carré. L'évaluation statistique des données recueillies lors du test des cotylédons est réalisée avec le test de Dunnet à P=0.01. L'incidence de la maladie pour l'essai en pots sous serre est analysée avec une ANOVA à un seul facteur avec P≤0.01. Ces analyses statistiques sont menées avec le logiciel Sigma Stat, Inc., Log. Labo, SYSTAT.

Les résultats de l'essai *in vivo* des deux isolats antagonistes RN 39e et RN 69 sont analysés statistiquement avec une ANOVA et des comparaisons des moyennes. Les densités optiques sont des moyennes de six valeurs et les moyennes sont analysées avec le test de Newman et Keuls avec P=0.05. Le logiciel Statistica version 6 est utilisé pour la réalisation de ces dernières analyses statistiques.

III-Résultats et Discussion

1- Dénombrement des *Pseudomonas* fluorescents et de la flore totale

Le dénombrement des populations bactériennes provenant des différents sites étudiés a été réalisé. Le nombre des bactéries cultivables totales est significativement supérieur à celui des *Pseudomonas* spp. fluorescents dans tous les échantillons. Les chiffres rapportés ici sont inférieurs à ceux obtenus par d'autres auteurs (Sutra *et al.* 2000). Toutefois, les pourcentages de *Pseudomonas* spp. fluorescents par rapport à l'ensemble des bactéries cultivables isolées du SR et du RH (7 et 20 %, respectivement) (Figure III.3) sont semblables à ceux observés chez d'autres plantes, telles que le bananier et le riz. Vlassak *et al.* (1992) ont étudié les populations bactériennes dans différentes parties de la rhizosphère du riz et de la banane au Sri Lanka. Ils ont trouvé que pour le riz, le nombre total des bactéries aérobies cultivables et celui de la population des bactéries fluorescentes étaient plus élevés dans le rhizoplan que dans l'exorhizosphère (sol rhizosphérique dans notre cas). Cependant, l'inverse a été observé pour le bananier. En effet, ils rapportent que le pourcentage des bactéries fluorescentes était significativement plus élevé sur le bananier (10,8%) que sur le riz des zones humides et sèches de Sri Lanka (4,3% et 2,7%, respectivement). Dans la fraction endorhizosphérique du riz, les populations bactériennes ont été très faibles et les bactéries fluorescentes étaient complètement absentes.

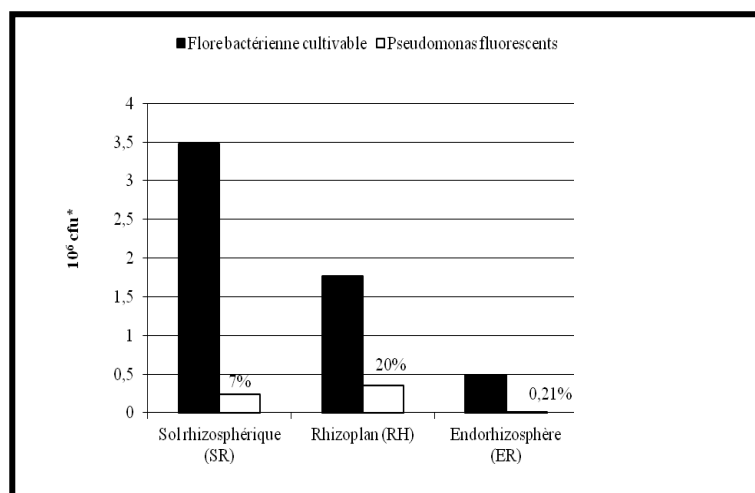


Figure III.3: Dénombrement des PF et de la flore bactérienne cultivables dans le sol rhizosphérique (SR), le rhizoplan (RH) et l'endorhizosphère (ER). * : par gramme de sol sec pour le SR et par gramme de racines fraîches pour RH et ER. (Amkraz *et al.* 2010)

Comme il a été rapporté par Boubyach *et al.* (2001), les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont principalement isolés du RH. Dans notre étude, nous avons isolé 303 *Pseudomonas* spp. fluorescents dont 44 % ont été isolés du RH, 31 % du SR et 25 % de l'ER (Figure III.4). Ces

pourcentages sont parfaitement conformes à ceux rapportés dans la littérature. En effet, Hagedorn *et al.* (1989) ont dénombré les rhizobactéries du sol rhizosphérique et du rhizoplan des plants de coton à différents stades de croissance de ces plants. 1000 isolats ont été identifiés au niveau du genre et caractérisés pour le contrôle de *Pythium ultimum* et *Rhizoctonia solani*. Les plants de coton ont d'abord été colonisés par des bactéries de nombreux genres, et les populations atteignent rapidement 10^8 ufc g⁻¹ de tissu racinaire. D'après les résultats de ces auteurs, les *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été les plus représentées des rhizobactéries et ont fourni le plus grand nombre d'isolats antifongiques.

Cependant, les résultats relatifs à l'abondance des bactéries dans les sols doivent être interprétés avec précaution. Une haute variabilité a été observée en dénombrant les *Pseudomonas* spp. fluorescents dans plusieurs échantillons du même sol (Sutra *et al.* 2000). Cette variabilité pourrait être la conséquence de pratiques culturales et/ou de l'utilisation des produits chimiques (Sutra *et al.* 2000). Généralement, l'abondance des rhizobactéries dans le SR est liée à la présence des exsudats racinaires autour des racines ; ce qui favorise la multiplication bactérienne. Le passage vers le rhizoplan puis vers les tissus internes des racines est marqué par une diminution nette des populations bactériennes. Seuls les microorganismes résistants aux conditions extrêmes peuvent se maintenir et nicher au niveau du RH et ER. C'est pour cette raison que le choix d'un *potentiel* agent de contrôle biologique se fait généralement parmi les microorganismes qui colonisent bien le RH et l'ER. A peu près 70% des *Pseudomonas* spp. fluorescents que nous avons isolés sont originaires de ces deux compartiments (Figure III.4) ; ce qui en fait des cibles potentiellement intéressantes pour la recherche et l'isolement d'un agent de contrôle biologique.

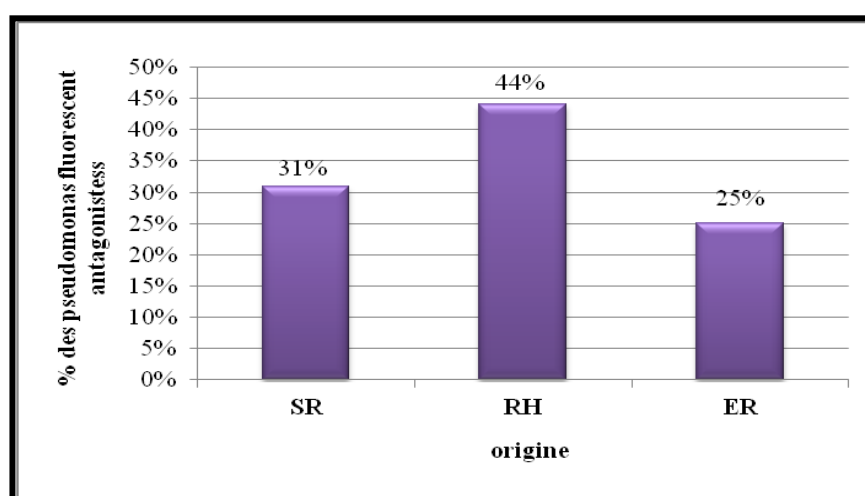


Figure III.4: Répartition des *Pseudomonas* spp. fluorescents selon leur origine.
RS : sol rhizosphérique, RH : rhizoplan et ER : endorhizosphère.

L'étude réalisée par Lamari et Sabaou (1993) portait sur la distribution quantitative et qualitative de la population bactérienne dans la rhizosphère de deux cultivars de palmier dattier, l'un résistant et l'autre sensible à la fusariose, ainsi que sur le pouvoir antagoniste de ces bactéries envers l'agent pathogène, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Ces auteurs ont constaté que le cultivar sensible stimule davantage la croissance des bactéries dans la zone externe des jeunes racines par rapport au cultivar résistant. L'identification des 665 isolats leur a permis de définir deux principaux genres : *Pseudomonas* et *Bacillus*. D'autres bactéries du groupe des corynéformes telles que *Arthrobacter*, *Brevibacterium* et *Pimelobacter* figurent parmi leur collection. Des différences dans la composition en genres et en espèces sont notées entre les cultivars. Ces différences varient suivant le type de racines (jeunes ou âgées) et la zone racinaire considérée (externe ou interne). En effet, dans la zone externe, *Pseudomonas caryophylli* et *Pseudomonas gladioli* sont plus abondants chez le cultivar sensible. Dans l'endorhizosphère, *Bacillus firmus* est nettement plus fréquent chez le cultivar résistant, et *Pseudomonas fluorescens* biovar II chez le cultivar sensible. Des différences sont également notées dans les pourcentages de bactéries antagonistes de *F. o. albedinis* (Lamari et Sabaou, 1993). Cette étude confirme bien nos résultats ainsi que ceux rapportés par de nombreux auteurs et selon lesquels les plantes seraient capables de contrôler les populations bactériennes de leur propre rhizosphère voir même de définir les groupes taxonomiques qui y domineraient (Hagedorn *et al.* (1989). Lors d'une étude plus récente Berg *et al.* (2005) confirment ces mêmes constats en montrant que la rhizosphère et le rhizoplan abritent le plus grand nombre d'antagonistes par rapport aux autres compartiments analysés (phylosphère et endosphère). La représentativité des *Pseudomonas* spp. fluorescents parmi les isolats bactériens antagonistes isolés est sans équivoque. En effet, 69 *Pseudomonas putida* (20 %) sont recensés parmi les 349 antagonistes obtenus.

2- Screening des isolats de *Pseudomonas* à base de leur antagonisme *in vitro*

Tous les *Pseudomonas* spp. fluorescents isolés (303) ont inhibé *in vitro* la croissance de l'isolat de référence H195 de *C. m.* subsp. *michiganensis*. Rappelons que 210 isolats ont été obtenus à partir des racines de tomate (RH + ER). Le diamètre des zones d'inhibition (ZI) oscille entre 2 et 40 mm sur le milieu NBYA. Un total de 62 isolats ont développé des zones d'inhibition entre 20 et 40 mm, 174 isolats ont présenté des zones d'inhibition allant de 10 à 20 mm et 67 avaient des zones d'inhibition qui varient entre 2 et 10 mm (Tableau III.2). Bien que certains auteurs avancent qu'il n'y a aucune corrélation entre l'antagonisme *in vitro* et le

contrôle des maladies des plantes *in vivo* (Barnett *et al.*, 1999) ; d'autres chercheurs ont montré clairement qu'une zone d'inhibition supérieure ou égale à 13 mm constitue un très bon critère pour l'isolement *in vitro* de bactéries antagonistes (Xu et Gross, 1986 ; Boudyach *et al.*, 2001 ; Boudyach, 2004). Selon ce critère, plus que la moitié de notre collection peut être soumise à la sélection *in vitro*.

Tableau III.2: Répartition des *Pseudomonas* spp. fluorescents antagonistes selon leur origine et leur groupe d'inhibition.

Groupes	I	II	III		
	$20 \leq ZI \leq 40$	$10 \leq ZI < 20$	$2 \leq ZI < 10$		
Origine				Total	%
SR	22	58	13	93	30,7
RH	11	82	41	134	44,3
ER	29	34	13	76	25
Total	62	174	67	303	100
%	20,5	57,5	22	100	

Nous avons remarqué la présence de deux types de zones d'inhibition. Ainsi, ces zones peuvent présenter un aspect net et bien défini ou alors mal délimité et progressif (Figure III.5). En effet, certains isolats bactériens forment des zones bien délimitées (isolat RN 47e) alors que d'autres induisent des zones diffuses (isolat RN 63). Cette différence peut être expliquée par la production, par les antagonistes, de molécules différentes dans le milieu et ayant des modes d'action différents vis-à-vis du pathogène. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents antagonistes sont en effet connues pour être productrices d'une panoplie de molécules inhibitrices qui leur confèrent leur caractéristiques d'agents potentiels de contrôle biologique de plusieurs phytopathogènes et agents délétères des cultures. Cette production des molécules inhibitrices impliquées dans l'antibiose *in vitro* constitue le premier critère ciblé dans un travail de recherche et de screening des rhizobactéries agents potentiels du contrôle biologique de divers pathogènes par plusieurs équipes de recherche. Berg *et al.* 2005 ont montré que parmi 2468 isolats bactériens récupérés à partir de la rhizosphère, l'endosphère et la phyllo-sphère des plants de pomme de terre, 14.4% (349 isolats) ont une activité antifongique envers deux champignons : *R. solani* et *V. dahliae*. Dans notre étude, le

nombre isolé est de 303 *Pseudomonas* spp. fluorescents et tous ces isolats ont une activité antibactérienne *in vitro*.

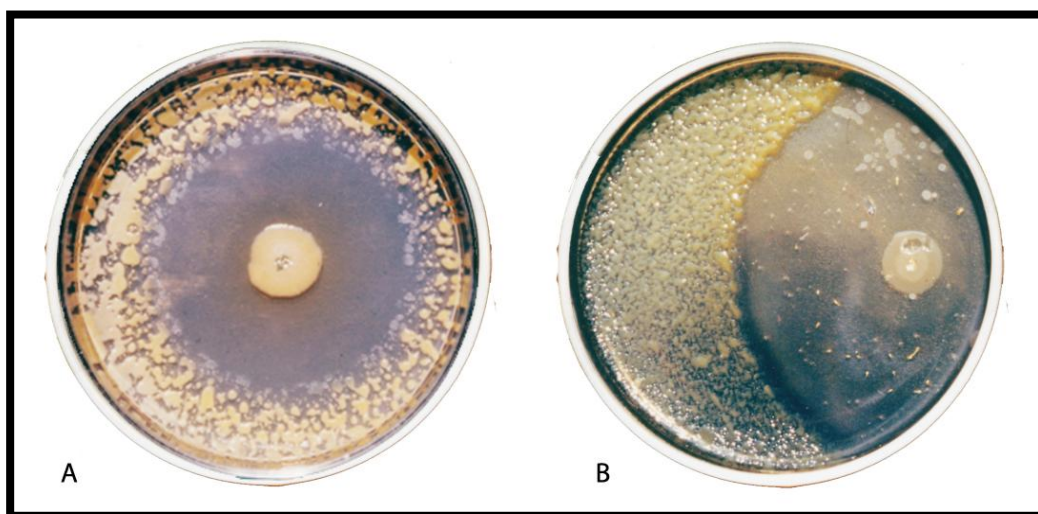


Figure III.5: Inhibition de la croissance de *C. m. subsp. michiganensis* en présence de deux isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents RN 63 (A) et RN 47e (B) sur milieu NBYA à 26°C après 4 jours de co-culture.

3- Colonisation des racines par les *Pseudomonas* spp. fluorescents sélectionnés

A partir des isolats sauvages de *Pseudomonas* spp. fluorescents antagonistes sélectionnés, quarante deux mutants marqués par la résistance aux antibiotiques ont été obtenus. Tous les isolats testés colonisent le système racinaire des plants de tomate en formant des manchons qui couvrent le système racinaire des plantules. Ces manchons bactériens apparaissent continus autour des fragments des racines (Figure III.6). Il faut noter qu'ils apparaissent fluorescents sous UV à 365 nm.

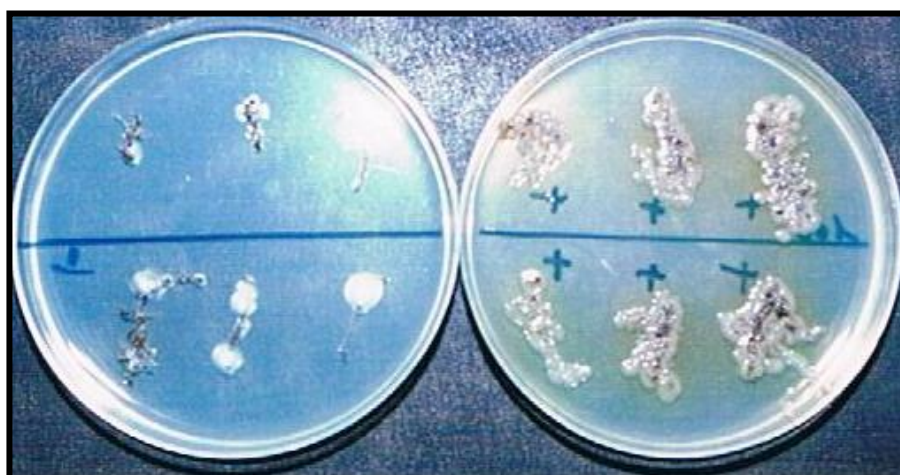


Figure III.6 : Colonisation des racines des plantules de tomate par un isolat de *Pseudomonas* spp. fluorescent antagoniste de *C. m. subsp. michiganensis*. Observation sous lumière naturelle.

Le potentiel colonisateur des isolats testés varie en termes de pourcentage de plantes colonisées (Figure III.7). L'analyse des résultats illustrés sur cette figure révèle que parmi l'ensemble des isolats testés, un groupe de 28 isolats a pu coloniser la totalité du système racinaire de 100% des plantules. Dix isolats ont réussi à coloniser la racine principale et les racines latérales de 75 % des plantules. Alors qu'un seul isolat ne présente ce potentiel que pour 50 % des plants testés. Enfin, les trois derniers isolats n'arrivent à coloniser la racine principale et les racines latérales que chez 25 % de plants. L'analyse statistique montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les isolats testés. On peut donc en conclure que tous les isolats testés se sont parfaitement adaptés au système racinaire de la tomate et peuvent donc être considérés comme de bons colonisateurs de ces racines.

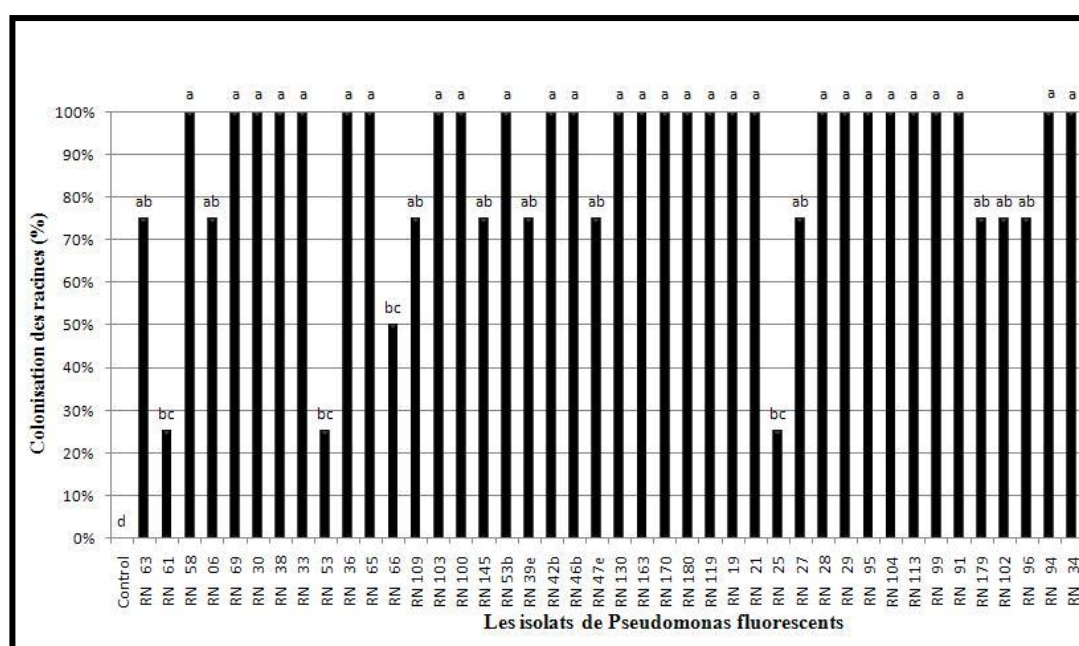


Figure III.7 : Colonisation racinaire (pourcentage des plantules avec racines colonisées) par les *Pseudomonas* fluorescents. Les barres avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $P \leq 0.05$ (Amkraz *et al.* 2010).

Weller (1988) avait décrit un bon agent colonisateur comme étant celui qui arrive à coloniser toutes les parties du système racinaire tout en restant pendant plusieurs semaines en présence de la microflore naturelle du sol. Justement, notre expérience a été conduite dans un sol naturel (sable fin de la vallée du Souss-Massa Draa) dans le but d'évaluer l'aptitude des bactéries sélectionnées à confronter la microflore naturelle. Schorth et Hancock (1982) ont rapporté que seulement 2 à 5 % des bactéries isolées des racines sont capables de coloniser efficacement la rhizosphère. Boudyach *et al.* (2001) ont montré que le pourcentage des plantules colonisées varie entre 8 et 90 %. Nos résultats ont révélé que 67% (28/42) des mutants résistants aux antibiotiques et presque 12% (28/236) des meilleurs antagonistes ($ZI \geq$

10mm) colonisent tout le système racinaire. Toutefois, les modalités de colonisation des racines par les antagonistes doivent être développées dans d'autres études incluant la quantification de la colonisation en fonction de l'âge de la plante, de la variété et de la présence ou l'absence du pathogène. Tout ceci dans le but d'optimiser l'efficacité de ces antagonistes dans le contrôle biologique du chancre bactérien de la tomate. En effet, Tucci *et al.* (2011) ont démontré que la capacité des souches de *Trichoderma* à accroître la biomasse végétale et à limiter l'infection par *B. cinerea*, dépend de la variété de la tomate testée. Ainsi, pour une même souche de *Trichoderma*, différents degrés d'efficacité sont observés selon le génotype utilisé. Ces auteurs ont montré également que, pour certaines variétés, la présence de *Trichoderma* induit une activation de certaines voies de défense en l'absence du pathogène. Face à l'attaque par ce dernier, la réponse de la plante est plus rapide et intense, expliquant l'efficacité de la protection.

4- Evaluation du contrôle du chancre *in vivo*

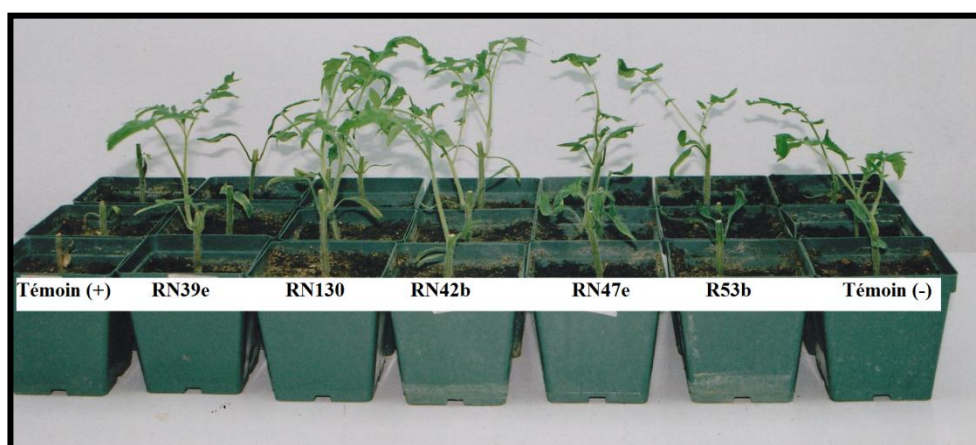
4.1- Test des cotylédons

Le tableau III.3 illustre les résultats obtenus avec les 42 isolats testés. Ces résultats montrent que parmi les 42 isolats testés, huit *Pseudomonas* fluorescents (RN 39e, RN 42b, RN 47e, RN 53b, RN 58, RN 63, RN 69 et RN 130) réduisent significativement l'incidence du dessèchement des cotylédons par rapport au témoin. On constate en effet que les plantes traitées par les antagonistes repoussent malgré l'infection par le pathogène (Figure III.8). Alors que cette incidence de dessèchement des cotylédons atteint 100% dans le cas du témoin positif en moins de 4 jours après traitement avec l'EDS, elle ne dépasse pas 50% dans le cas des traitements avec les huit antagonistes retenus. Par ailleurs, on doit noter qu'il n'y a pas de différence significative entre ces huit isolats à $P = 0.01$.

Chaldecott et Preece (1983) ont rapporté que tous les isolats de *Clavibacter*, testés lors de leur étude, développent le symptôme caractéristique après trois jours de leur application sur les sections des cotylédons. Ces auteurs ont prouvé que le test des cotylédons peut être utilisé pour confirmer le pouvoir pathogène de ce genre bactérien. Nos résultats suggèrent que le test des cotylédons peut être considéré comme une technique potentielle pour le screening *in vivo* des bactéries antagonistes avant l'évaluation de leur efficacité *in situ* (sous serre et/ou en plein champ). En effet la capacité d'une bactérie antagoniste de réduire l'incidence du dessèchement des cotylédons lui confère certainement plus de chance d'être un agent efficace au champ.

Tableau III.3 : Incidence du dessèchement des cotylédons (ID) avec les 42 isolats antagonistes

Isolats	ID	Isolats	ID	Isolats	ID
Témoin +	100,00 ± 0,0 ^a	RN103	72,23 ± 0,3 ^a	RN27	92,23 ± 0,3 ^a
RN58	50,12 ± 0,3 ^b	RN100	80,23 ± 0,5 ^a	RN28	98,23 ± 0,4 ^a
RN63	50,23 ± 0,3 ^b	RN145	91,23 ± 0,3 ^a	RN29	89,14 ± 0,5 ^a
RN69	50,25 ± 0,3 ^b	RN36	83,43 ± 0,7 ^a	RN95	85,22 ± 0,3 ^a
RN130	50,22 ± 0,1 ^b	RN65	86,33 ± 0,6 ^a	RN104	90,23 ± 0,3 ^a
RN39e	41,67 ± 0,3 ^b	RN25	80,23 ± 0,5 ^a	RN113	92,23 ± 0,4 ^a
RN42b	41,67 ± 0,3 ^b	RN46b	90,23 ± 0,3 ^a	RN99	98,13 ± 0,4 ^a
RN47e	33,33 ± 0,1 ^b	RN66	92,23 ± 0,4 ^a	RN91	91,23 ± 0,3 ^a
RN53b	41,67 ± 0,4 ^b	RN109	78,43 ± 0,7 ^a	RN179	80,23 ± 0,6 ^a
RN61	80,23 ± 0,5 ^a	RN163	78,43 ± 0,5 ^a	RN102	87,13 ± 0,5 ^a
RN06	78,33 ± 0,7 ^a	RN170	76,43 ± 0,3 ^a	RN96	91,23 ± 0,4 ^a
RN30	82,43 ± 0,6 ^a	RN180	80,23 ± 0,6 ^a	RN94	95,13 ± 0,5 ^a
RN38	84,53 ± 0,5 ^a	RN119	88,13 ± 0,3 ^a	RN34	87,23 ± 0,4 ^a
RN33	91,23 ± 0,6 ^a	RN19	82,23 ± 0,3 ^a	Témoin -	00,00 ± 0,0 ^c
RN53	90,23 ± 0,3 ^a	RN21	78,22 ± 0,3 ^a		

**Figure III.8** : Schéma d'un bloc du test des cotylédons avec les isolats RN39e, RN130, RN42b, RN47e et RN53b.

4.2- Contrôle du chancre en pots sous serre

Au cours de cette expérience, les huit isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents retenus lors de l'essai précédent, sont soumis à un test d'évaluation du contrôle du chancre en pots sous serre. Les résultats obtenus montrent que les symptômes sont observés après 15 jours dans le cas du témoin infecté. A l'inverse, ces symptômes n'apparaissent au niveau des plantules issues des semences bactérisées et dont les racines ont été traitées qu'après 70 jours. Si on analyse de manière générale la réduction de l'incidence de la maladie, on s'aperçoit que tous les isolats testés réduisent significativement l'incidence de la maladie (IM) par rapport au témoin (Tableau III.4). En effet, cette incidence dans le cas du témoin est de 65,4 % alors que dans le cas des plantes traitées, avec les *Pseudomonas* fluorescents antagonistes, elle ne dépasse pas 25,5 %. Le pourcentage de réduction de cette incidence (RI) par rapport au témoin varie entre 61,0 et 83,2 %. Les isolats les plus efficaces sont RN 39e et RN 69 dont l'IM était de 13,5 et 11,0 %, respectivement, avec une RI de l'ordre de 79,4 et 83,2 %. Boudyach *et al.* (2001) ont observé que le pourcentage de réduction de cette incidence atteint 100% dans le cas d'une bactérisation des semences suivie par un traitement des racines avec des *Pseudomonas* spp. fluorescents antagonistes isolés lors d'une étude antérieure. Selon ces auteurs, la compétition entre les antagonistes et le pathogène, pour les éléments nutritifs ainsi que pour l'espace, augmente avec la taille de la population des antagonistes au niveau des racines. Par ailleurs, la compétition pour les nutriments est très probablement impliquée dans la plupart des interactions entre les *Pseudomonas* fluorescents et les pathogènes au niveau de la rhizosphère et elle est partiellement responsable de l'activité antagoniste observée chez ces bactéries. Cette hypothèse concorde parfaitement avec les résultats obtenus lors de notre étude. Cependant, il faut analyser cette hypothèse par rapport à d'autres études qui incluront les trois éléments : l'agent du contrôle biologique sélectionné, le pathogène et la plante hôte (la tomate) dans des modèles simples et bien adaptés permettant d'analyser l'effet de chaque composant séparément. C'est dans cette optique que Courtade (1997) a utilisé un modèle qui inclut un *Pseudomonas* fluorescent antagoniste (M.3.1.), une plante hôte qui est le maïs et un pathogène qui est *Fusarium roseum*. Les résultats obtenus par cet auteur suggèrent que les populations bactériennes introduites sont très influencées par les exsudats racinaires et par la présence ou l'absence du pathogène. Cet auteur rapporte aussi que les effets bénéfiques de M.3.1 ne sont remarquables qu'en présence du pathogène. Dans le même cadre, Latour *et al.* (2003) indiquent que les *Pseudomonas* spp. considérés comme bactéries compétentes (antagonistes et colonisateurs) ont un métabolisme spécifique caractérisé par l'efficacité de

leur pyoverdine comme médiateur de l'assimilation du fer ainsi que par leur habilité à réduire les oxydes d'azote. En réalité, le fer en tant qu'élément très peu bio disponible, mais bien essentiel à la vie des microorganismes ainsi qu'à celle des plantes, est hautement régulé dans l'environnement rhizosphérique par les sidérophores telles que la pyoverdine, la pyochéline et la ferribactine. Ainsi, ces molécules induiraient la modification des métaux présents dans le sol vers des formes qui pourraient être plus facilement et rapidement mobilisables par les plantes.

Tableau III.4: Effet des isolats antagonistes sélectionnés sur l'incidence du chancre bactérien de la tomate (en pots sous serre) (Amkraz *et al.* 2010)

Traitements	Incidence de la maladie (%) [*]	Réduction de l'incidence (%) ¹
Témoin	65,4 ± 8,2 ^c	0,0 ± 0,0 ^A
Isolats		
RN 53b	25,5 ± 1,0 ^d	61,0 ± 7,2 ^B
RN 47e	22,5 ± 1,2 ^d	65,5 ± 7,0 ^B
RN 130	21,0 ± 1,5 ^d	68,0 ± 6,7 ^B
RN 42b	23,5 ± 1,2 ^d	64,0 ± 7,0 ^B
RN 39e	13,5 ± 1,2 ^f	79,4 ± 7,0 ^D
RN 63	18,0 ± 1,0 ^{de}	72,5 ± 7,2 ^{BC}
RN 58	16,5 ± 1,0 ^{de}	74,7 ± 7,2 ^{BC}
RN 69	11,0 ± 1,2 ^f	83,2 ± 7,0 ^D

^{*} Les valeurs avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $P \leq 0.01$.

¹: Pourcentage de réduction de l'incidence du chancre par rapport au témoin. Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $P \leq 0.01$.

4.3- Contrôle du chancre dans les conditions de production de la tomate

Cet essai a été réalisé avec les deux meilleurs isolats antagonistes retenus lors du test précédent à savoir RN 69 et RN 39e. Les résultats obtenus confirment une fois de plus l'efficacité de ces deux isolats dans la réduction de l'incidence de la maladie. En effet, leur application seuls RN 39e ou RN 69 ou en mixture a réduit IM à 21,5%, 23,5 % et 11,5 respectivement (Tableau III.5). Il est important de noter que les symptômes du chancre sont apparus chez le témoin un mois après l'inoculation par le pathogène, alors que les plants traités par les antagonistes n'ont montré les symptômes qu'après quatre mois. L'allongement du délai d'incubation du chancre s'explique parfaitement par l'effet bénéfique des antagonistes appliqués sur les plants de tomate. Toutefois, nous pensons que le développement de la maladie chez les plants traités est probablement dû aux apports

supplémentaires et excessifs de l'agent pathogène. En effet Shah-Smith et Burns (1996, 1997), ont affirmé que l'efficacité de *Pseudomonas putida* 40RNF dans la réduction de la fonte de semis de la betterave à sucre causée par *Pythium* spp. dépend de la concentration en antagoniste appliquée sur les semences et de la quantité du pathogène présent dans sol. Ces auteurs ont constaté que des concentrations bactériennes entre 2×10^6 et 6×10^7 UFC/semences, étaient aussi efficaces que le fongicide utilisé. En outre, Moënné-Loccoz *et al.* (1999) ont observé que le pourcentage de plants sains de la betterave à sucre hébergeant 10^6 - 10^7 ufc de *P. fluorescens* F113 par graine au moment du semis, est statistiquement identique à celui obtenu par un traitement fongicide. Dans ce sens, Raaijmakers *et al.* (1995) avaient déjà démontré l'existence d'un seuil d'inoculum en dessous duquel une petite diminution de la dose des antagonistes entraîne un changement notable au niveau des résultats de la lutte contre les maladies. Dans une étude très récente, Zhou *et al.* (2012) rapportent que *Pseudomonas brassicacearum* J12 supprime significativement le flétrissement bactérien de la tomate causé par *Ralstonia solanacearum* au cours d'un essai sous serre. Le pourcentage de suppression de la maladie est de l'ordre de 45.5%. La molécule antibactérienne de cette souche est identifiée, par HPLC-ESI-MS, comme étant le 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG).

Tableau III.5: Réduction *in vivo* de l'incidence du chancre bactérien de la tomate par les deux isolats de *Pseudomonas* fluorescents RN 39e et RN 69. (Essai en champ sous serre)

Traitements	Incidence du chancre bactérien (%)	Réduction de l'incidence (%)
Témoin (Non traité)	$64,5 \pm 1,00^a$	$00,00 \pm 00,0$
L'isolat RN 39e	$21,5 \pm 1,22^b$	$66,67 \pm 0,22$
L'isolat RN 69	$23,5 \pm 0,82^b$	$63,57 \pm 0,18$
Mixture de RN39 et RN69	$11,5 \pm 1,22^b$	$82,18 \pm 0,22$

4.4- Evaluation de la vigueur des plantes en présence des isolats antagonistes testés

Les isolats antagonistes testés ont un effet stimulateur notable sur la croissance des plantules de tomate. En effet, la hauteur des tiges, le poids sec des racines, le diamètre au collet ainsi que le poids sec et frais des plantules ont été significativement améliorés par rapport au témoin surtout après un mois de la transplantation. Par ailleurs, pour tous les paramètres analysés, cette amélioration est accentuée lors de l'utilisation de la mixture des antagonistes. Ainsi, après un mois de la transplantation, on note un gain de 35,19 et 32,17 %

par rapport au témoin pour la hauteur des tiges et le diamètre au collet, respectivement (Tableau III.6 et III.7). L'amélioration du poids sec des racines est associée à un meilleur développement de celles-ci. Le poids sec, aussi bien des racines que des tiges, est significativement amélioré par rapport au témoin pour les trois types de traitements testés. Une nette augmentation du poids frais des plantules est également relevée un mois après la transplantation (Tableau III.8).

Tableau III.6 : Effet des isolats RN 39e et RN 69 sur la hauteur moyenne des tiges des plantules de tomate

Traitements	Hauteur moyenne (cm) et Gain / témoin (%)			
	15 jours	Gain / témoin (%)	1 ^{er} mois	Gain / témoin (%)
Témoin	28,24 ± 0,54 ^a		40,89 ± 0,65 ^a	
RN39e	30,32 ± 0,83 ^{ab}	07,36	51,72 ± 0,32 ^b	24,48
RN69	29,56 ± 0,65 ^{ab}	04,67	50,14 ± 0,24 ^b	22,62
Mixture	32,81 ± 1,20 ^b	16,18	55,28 ± 0,45 ^b	35,19

Des lettres différentes sur la même colonne indiquent que les valeurs sont significativement différentes à P = 0,05 avec le test de Newman et Keuls.

Tableau III.7 : Effet des isolats RN 39e et RN 69 sur le diamètre au collet des plantules de tomate un mois après la transplantation

Traitements	Diamètre au collet	Gain / témoin (%)
Témoin	2,86 ± 0,50 ^a	
RN39e	3,60 ± 0,25 ^b	28,32
RN 69	3,61 ± 0,50 ^b	26,22
Mixture	3,78 ± 0,54 ^b	32,17

Des lettres différentes indiquent que les valeurs sont significativement différentes à P = 0,05 avec le test de Newman et Keuls.

Tableau III.8 : Effet des isolats RN 39e et RN 69 sur le poids sec des racines et des tiges ainsi que le poids frais des plantules de tomate après un mois de la transplantation

Traitements	Poids sec des racines (g)	Poids sec des tiges (g)	Poids frais des plantules (g)
Témoin	1,24 ± 0,50 ^a	6,48 ± 0,25 ^a	25,80 ± 1,2 ^a
RN39e	1,64 ± 0,25 ^b	7,24 ± 0,50 ^b	36,44 ± 0,8 ^b
RN 69	1,73 ± 0,50 ^b	7,45 ± 0,22 ^b	38,36 ± 1,3 ^b
Mixture	1,82 ± 0,54 ^b	8,67 ± 0,34 ^b	39,27 ± 1,1 ^b

Des lettres différentes indiquent que les valeurs sont significativement différentes à P = 0,05 avec le test de Newman et Keuls.

Ces résultats s'accordent bien avec ceux de l'équipe de Gamalero (2002) qui a montré que les souches *Pseudomonas* spp. fluorescents ont stimulé significativement la croissance du système racinaire des plantes de la tomate. De même, les travaux de Esitken *et al.* (2006) ont montré que les souches de *Pseudomonas* BA-8 et *Bacillus* OSU-142 seuls ou en combinaison augmentent la nutrition, la croissance et le rendement des plantes de cerisier. Par ailleurs, KiranKumar (2007) a affirmé que la souche *Pseudomonas* B-25 (parmi 47 PGPR testées) améliore nettement la croissance de la tomate. Cet effet stimulant s'est traduit à de multiples niveaux : augmentation de la hauteur des plantes de 49,66%, du nombre des feuilles de 88,64%, de la biomasse de 66,55% et de la production des fruits de 102% par rapport au témoin non inoculé. De plus, cette amélioration est associée à un contrôle total (100%) de l'incidence de la virose causée par le virus de la mosaïque de la tomate (TMV). Cette amélioration de la croissance de la plante stimulée semble être en parfaite corrélation avec un développement intense du système racinaire des plantes traitées. Ainsi, des essais réalisés par Burkett-Cadena *et al.* (2008) pour évaluer les effets de quatre préparations commerciales à base de rhizobactéries sur la suppression des nématodes à gales et la promotion de la croissance de la tomate ont révélé la capacité de tous ces inoculas à induire une amélioration du poids des racines. Les préparations commerciales AgBlend et BioYield semblent être les plus efficaces du fait qu'elles induisent un gain de l'ordre de $18,18 \pm 0,42$ et $27,18 \pm 1,90$ respectivement par rapport au témoin. La stimulation de la croissance des plantes inoculées par chacun de ces isolats, pourrait être expliquée par le fait que ces rhizobactéries du genre *Pseudomonas* augmenteraient la surface et donc le taux des échanges au niveau du système racinaire. Par conséquent, cela permet une meilleure exploration du sol d'où l'assimilation active d'eau et des nutriments indispensables aux plantes en particulier le fer entraînant ainsi un meilleur développement de la partie aérienne des plantes. Ceci a été effectivement corroboré par d'autres études, notamment ceux de Zare *et al.* (2011) qui ont rapporté l'augmentation du poids sec des racines et du poids sec des tiges des plants de tomate traitées par une souche de *Pseudomonas putida*. Si à l'heure actuelle et à l'échelle internationale, le bénéfice apporté par rapport à la croissance des plantes après la bactérisation par les bactéries dites PGRP est bien admis par de nombreuses équipes, les mécanismes précis qu'utilisent ces bactéries semblent d'une part multiples et d'autres parts varient d'un système (pathogène/plante/antagoniste) à l'autre. Ainsi, certains auteurs ont montré que la stimulation de la croissance et du rendement des plantes après leur inoculation avec les PGPR implique la solubilisation du Phosphate, du Potassium et par la stimulation de l'absorption de l'azote

atmosphérique en le rendant assimilable par la plante (Glick *et al.* 2007). Selon d'autres auteurs comme Satrani *et al.* (2009) la stimulation active par deux *Pseudomonas* spp. fluorescents A6RI et TGI252 de la longueur de la tige, du diamètre du collet, et du nombre de racines courtes de *Cedrus atlantica* est directement liée à la sécrétion des phytohormones synthétisées par ces souches rhizobactériennes. Ces phytohormones agiraient par renforcement ou accélération du développement à la fois du système racinaire et de la partie aérienne des plantes. Par conséquent, la surface des racines est amplifiée ; ce qui intensifie l'absorption des éléments nutritifs, de l'eau et des minéraux par les plantes. Parmi les phytohormones impliquées dans cet effet potentialisant la croissance des plantes, l'acide indole-3-acétique (AIA), dont la production par certaines PGPR a révélé ses effets bénéfiques dans la rhizogénèse. Par ailleurs, il a été démontré que ces PGPR interviennent également par production de sidérophores. Digat *et al.* (1993) ont en effet montré que *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* synthétisent la pyoverdine et la pseudobactine qui sont des molécules capables de chélater le fer ferrique le rendant non disponible pour les autres microorganismes, qui sont donc exclus de la rhizosphère colonisée. Cette exclusion ne pourrait qu'être bénéfique pour la plante surtout si les microorganismes éliminés sont des agents pathogènes.

5- Effet des facteurs abiotiques sur la croissance des isolats RN 39e et RN 69

Les principaux facteurs abiotiques limitant la croissance et le rendement des plantes sont le déficit hydrique, la salinité, les températures extrêmes, les pH trop faibles ou trop importants et le manque relatif en éléments nutritifs. La combinaison de plusieurs contraintes peut affecter de manière très néfaste le développement et la productivité des plantes. Ces effets sont dus à la réduction des pigments photosynthétiques, de la capacité photosynthétique, de la conductance stomatique et de la transpiration. Ainsi, les taux d'accumulation de certains minéraux, tel que K, P, Mg, Ca et Fe, dans les pousses et les racines deviennent réduits et plusieurs activités enzymatiques diminuent dans la rhizosphère notamment la nitrogénase et la déshydrogénase ainsi que les activités de la catalase, de la peroxydase et la superoxyde dismutase dans les feuilles des plantes (Omar *et al.* 2009). Cependant, Vessey (2003) ont démontré que les *Pseudomonas* colonisateurs des racines, en raison de leur polyvalence catabolique ont le pouvoir de synthétiser une large panoplie d'enzymes et de métabolites qui aident la plante à résister aux divers stress biotiques et abiotiques.

5.1- Effet de la température

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau III.9. De manière générale, ces résultats montrent que pour les deux isolats testés, l'optimum de croissance se situe entre 25 et 35°C. De manière plus précise, ces rhizobactéries présentent une croissance progressive pour les températures allant de 10 à 30°C pour atteindre un niveau maximal entre 30 et 35°C. Ensuite, on note que cette multiplication bactérienne diminue de façon relativement brutale à partir de 35°C. Cependant, bien que la croissance bactérienne soit inhibée à partir de 55°C, les souches testées demeurent viables. En effet, leur viabilité a été vérifiée par ensemencement de boîtes de Pétri contenant le milieu KB avec les isolats auparavant incubés aux températures de 50 à 65°C. Ces résultats prouvent que les souches testées tolèrent bien les hautes températures (Tableau III.9). Ceci pourrait donc conférer à nos souches la possibilité de réduire l'effet nuisible des températures élevées sur les plants de tomate.

Tableau III.9 : Effet de la variation de la température sur la croissance des isolats RN 39e et RN 69

Température (°C)	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Isolats												
RN 69	0,35	0,85	1,1	1,4	1,6	1,5	0,5	0,1	0,1	0	0	0
RN 39 ^e	0,4	0,9	1,3	1,5	1,5	1,25	0,9	0,2	0,1	0	0	0

La croissance bactérienne est exprimée en DO à 640 nm. Les valeurs représentent une moyenne de six répétitions.

5.2- Effet du pH

Les résultats illustrant l'effet de la variation du pH sur la survie et la croissance des deux rhizobactéries antagonistes étudiées sont présentés sur la figure III.9. Ces résultats montrent que le développement de ces isolats aux pH de 3 à 4 est vraiment limité. Cependant, pour des valeurs de pH supérieures à 4, on note que la croissance bactérienne augmente de manière graduelle et le niveau optimal de multiplication bactérienne est obtenu pour des pH compris entre 6 et 8. Enfin, on observe que l'augmentation du pH au delà de la valeur 9 est associée à une baisse de la densité bactérienne (valeurs DO) pour les deux isolats bien que cette baisse ne soit pas significative à $P = 0,05$. A l'inverse, les variations de croissance bactérienne aux pH de 3 à 5 d'une part et celle aux pH allant de 5 à 11 d'autres parts sont significativement différentes. Tous ces résultats montrent bien que ces deux isolats antagonistes possèdent une capacité à résister à une variation très importante de pH. Ceci

offre la possibilité d'utiliser ces isolats antagonistes dans plusieurs sols à différents pH. Par ailleurs, la croissance de ces isolats est optimale dans l'intervalle de pH allant de six à huit qui coïncide avec le pH optimal de la croissance de *C. m. subsp. michiganensis* compris entre 5 et 7,4. Ce même intervalle est bel est bien celui favorable pour la culture de la tomate et bien d'autres plantes cultivées.

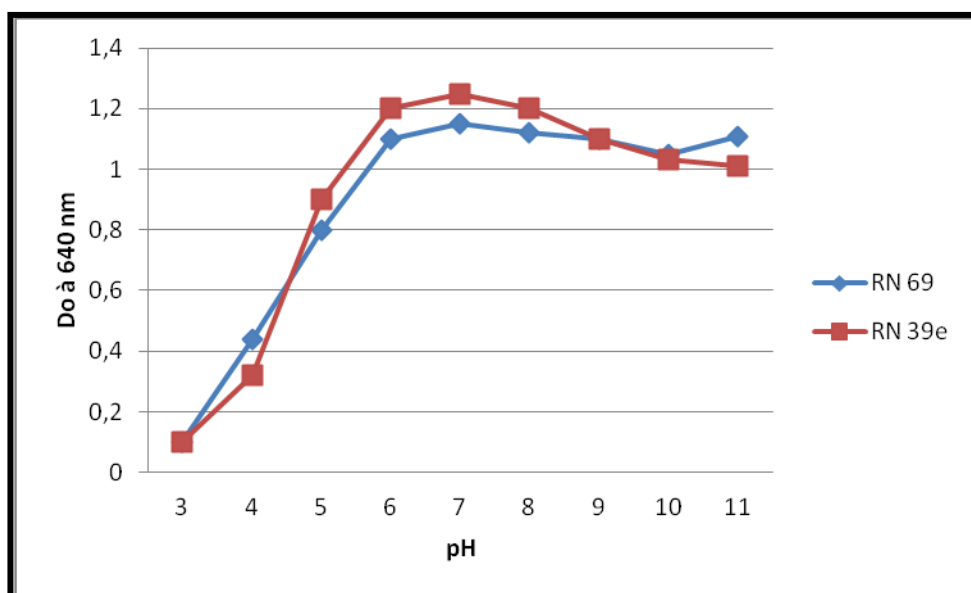


Figure III.9 : Effet de la variation du pH sur la croissance des isolats RN 69 et RN 39e. La croissance est exprimée en DO à 640 nm.

5.3- Effet des sels

D'après les résultats illustrés sur le tableau III.10, on observe que la croissance bactérienne diminue progressivement lors de l'augmentation de la concentration des trois sels testés. Cependant, l'ampleur de cette diminution varie d'un sel à l'autre. Il importe donc de noter que la multiplication bactérienne est plus affectée par les concentrations élevées de NaCl et de KCl que par celles de Na₂SO₄. Si on exprime les concentration des sels en mM, on note que les deux rhizobactéries se multiplient à des concentrations variant de 0 à 855 mM (0 à 5%) pour le NaCl, de 0 à 671 mM (0 à 5%) pour le KCl et de 0 à 528 mM (0 à 7,5%) en présence de Na₂SO₄.

Tableau III.10 : Effet de la variation de la concentration des sels (NaCl, Na₂SO₄ et KCl) sur la croissance des isolats RN 39e et RN 69. La croissance est exprimée en DO à 640 nm.

Croissance bactérienne exprimée en DO moyenne en fonction des concentrations des sels (%)					
Concentration des sels (w/v)	0	2.5	5	7.5	10
RN69					
NaCl	1.42 a	1.18 b	1 b	0.8 b	0 c
Na ₂ SO ₄	1.42 a	1.2 a	1.1 a	1 ab	0.5 c
KCl	1.42 a	1.25 b	1 b	0.4 bc	0 c
RN39e					
NaCl	1.38 a	1.15 b	0.9 b	0.7 b	0.2 c
Na ₂ SO ₄	1.38 a	1.3 a	1.2 a	0.9 b	0.5 c
KCl	1.38 a	1.1 a	0.8 b	0.6 b	0.1 c

Les valeurs sont des moyennes de six lectures (six tubes). Les valeurs de la même ligne suivies de mêmes lettres sont significativement différentes à $p = 0.05$.

Il est clairement admis que les cultures végétales sont régulièrement confrontées à une variété de stress liés à l'environnement. Parmi ces facteurs de stress, la salinité du sol constitue un des facteurs limitant la productivité végétale. Le rôle des bactéries antagonistes et promotrices de la croissance vis-à-vis des plantes ne pourrait donc s'exercer et aboutir à des effets bénéfiques significatifs et durables que si ces rhizobactéries résistent bien au stress salin. A travers le tableau III.10, nos résultats traduisent bien cette propriété d'halo tolérance des deux rhizobactéries qui pourraient continuer à exercer leurs effets phyto-protecteurs et stimuler la croissance des plants de tomate même dans des conditions de salinité élevées comme c'est le cas du sol dans certaines zones de la région du Souss-Massa Draa ; en particulier dans des conditions d'aridité qui sont de plus en plus fréquentes dans cette région vu les aléas climatiques de ces dernières années. Nos résultats confirment donc le caractère de résistance des antagonistes sélectionnés au stress salin, un caractère très recherché dans les biofertilisateurs. En effet, à travers un essai en pots mené sur les pois chiches, Patel *et al.* (2012) ont rapporté que les plants inoculés avec deux rhizobactéries (MSC1 et MSC4) en présence de NaCl (300 mM), ont présenté une augmentation des paramètres qui permettent d'évaluer la croissance des plantes (poids sec et poids frais) par rapport aux témoins non inoculés. Les souches MSC1 et MSC4 ont été identifiées comme étant *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, respectivement, d'après l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S. Ces deux isolats tolèrent en effet, des concentrations de 1 M de NaCl *in vitro*. Par ailleurs, Nadeem *et al.* (2012) ont rapporté que les rhizobactéries jouent un rôle important dans la réduction du stress des plantes causé par la salinité et par la sécheresse suite à la suppression de la production d'éthylène. Dans le même sens, Egamberdiyeva (2007) a déjà

démontré la capacité de *Pseudomonas alcaligenes* PsA15, *Bacillus polymyxa* BcP26 et *Mycobacterium phlei* MbP18 à tolérer les hautes températures et les concentrations élevées en sels; ce qui leur conférerait l'avantage majeur de pouvoir survivre dans des sols arides et salins tout en stimulant la croissance des plantes. Cette amélioration de la croissance des plantes est meilleure quand les sols sont déficients en nutriments (Egamberdiyeva, 2007). De même, Paul et Nair, (2008) ont rapporté que *Pseudomonas fluorescens* MSP-393 pourrait servir de PGPR idéal pour les cultures dans des sols salins grâce à sa grande tolérance de la salinité liée à sa capacité de synthèse d'un arsenal de protéines régulatrices. En outre, Omar *et al.* (2009), ont montré la réduction significative de l'effet de la salinité sur la croissance et le rendement suite à l'inoculation de deux cultivars d'orge par *Azospirillum brasilense*. Cette amélioration de la tolérance aux sels était due à l'augmentation de la teneur en pigments, de la réduction de l'accumulation de l'osmo-régulateur proline qui intervient dans le piégeage des radicaux libres; ce qui entraîne une réduction des activités des enzymes antioxydants (Omar *et al.* 2009).

En tenant compte de tout ce qui précède, on peut affirmer que les deux isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents retenus lors de cette étude peuvent être intéressants aussi bien comme antagonistes que comme stimulateurs de la croissance des plantes de tomate et ceci dans des conditions de stress salin. En effet, ces deux rhizobacéries supportent des concentrations élevées des sels testés. Le fait qu'elles soient tolérantes aux sels leur conférerait la possibilité de bien coloniser la rhizosphère où la pression osmotique est si élevée à cause des exsudats racinaires et où la succion radiculaire peut créer un potentiel de pression qui atteint -20 bars (Loper *et al.* 1984).

IV- Conclusion et perspectives

Au terme de cette étude nous avons pu montrer que la rhizosphère de la tomate originaire de la vallée du Souss-Massa Draa peut être une source de *Pseudomonas* spp. fluorescents qui possèdent une activité antagoniste significative contre l'agent du chancre bactérien aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (en pots sous serre et dans les conditions de production au champ). Leur répartition entre les différentes zones de la rhizosphère (SR, RH ou ER) est inégale. En effet, la zone la plus riche en antagonistes et particulièrement en *Pseudomonas* spp. fluorescents est le RH suivi par le SR. L'endorhizosphère semble être la zone la moins peuplée par ces antagonistes.

Les deux isolats RN39e et RN69 testés *in vivo* exercent une action protectrice importante comme agents de bio-contrôle et comme stimulateurs de la vigueur des plantes.

Cependant, il serait nécessaire d'élargir l'évaluation de ces isolats antagonistes au champ et d'approfondir les recherches sur les mécanismes précis impliqués dans l'antagonisme et l'effet améliorateur de la croissance pour pouvoir développer une solution efficace de contrôle biologique du chancre bactérien avec les deux isolats sélectionnés. L'évaluation de la protection de la tomate au champ par les antagonistes retenus sans apports supplémentaires de pathogène constituerait une perspective intéressante. L'estimation de l'effet protecteur des plantes par les antagonistes dans des conditions de stress (salinité, basse ou haute température....) pourrait être recherchée comme suite logique de ce travail afin de s'assurer de la capacité des isolats à résister à ces conditions extrêmes tout en protégeant la plante et l'aidant à mieux tolérer ces conditions. Un autre volet peut être envisagé c'est l'étude des mécanismes d'action des meilleurs isolats antagonistes du genre *Pseudomonas* tout en vérifiant s'il s'agit d'un mécanisme de compétition direct (nutritive, spatiale, parasitisme) ou indirect (induction de mécanismes de défense aussi bien anatomiques que biochimiques). L'élucidation de ces mécanismes d'action serait d'un très grand intérêt dans l'élaboration d'une stratégie de lutte intégrée efficace et durable contre le chancre bactérien de la tomate. Par ailleurs, les molécules produites par les isolats retenus doivent être analysés et leurs structures chimiques caractérisées. En effet, Ramanujam et Kulothungan (2011) ont décrit une nouvelle approche très promotrice pour l'introduction des métabolites secondaires de *Pseudomonas fluorescens* comme substances de bio control d'*Alternaria Alternata*.

CHAPITRE IV

Identification des *Pseudomonas*

spp. fluorescents antagonistes

sélectionnées

I- INTRODUCTION

L'identification des bactéries repose sur différentes méthodes faisant appel à des approches phénotypiques et génotypiques. Parmi les techniques phénotypiques on peut citer les caractères morphologiques (taille et forme de la bactérie, de la colonie), type de Gram, les caractères physiologiques, notamment ceux concernant les traits métaboliques (catabolisme de sucres comme sources de carbones, d'acides aminés et autres métabolites), les activités enzymatiques (catalase, oxydase, protéase, lécithinase...etc). Généralement ces études phénotypiques sont complétées par des études de chimiotaxonomie (profils des acides gras), des phospholipides, profil protéinique ; type de peptidoglycane, coefficient de chagraff ou pourcentage de C+G....etc). Actuellement, ces techniques simples pour la plus part ne sont plus les seules utilisées vu leur faible degré de discrimination entre les espèces bactériennes et doivent être complétés par d'autres études. Parmi ces dernières, l'outil de la biologie moléculaire s'avère très puissant et permet d'identifier de façon très précise les bactéries à l'échelle de l'espèce.

Durant ces dernières décennies, le développement de l'outil moléculaire a rendu possible l'analyse génotypique des espèces bactériennes. Le séquençage de l'ADN et de l'ARN ribosomal sont parmi les techniques les plus utilisés dans les études de taxonomie bactérienne. Parmi les outils les plus puissants, l'hybridation de l'ADN est sans conteste le plus efficace. Plusieurs gènes sont ciblés dont le plus adopté est celui codant pour l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) (Weisburg *et al.* 1991 ; Bossis *et al.* 2000 ; Attitala *et al.* 2007 ; Someya *et al.* 2012 ; Naz et Bano, 2010). Récemment, certains autres gènes ont été ciblés tels que les gènes de ménage *rpoB* codant pour la sous unité bêta de la polymérase ARN) (Mollet *et al.* 1997 ; Adékambi *et al.* 2009 ; Sajben *et al.* 2011). En effet, il a été montré que ce dernier fournit plus de précision que l'analyse de l'ARNr 16S et présente l'avantage d'être parfaitement corrélée aux hybridations ADN-ADN. A côté de ces techniques, d'autres méthodes telles que l'analyse des protéines cellulaires (Vancanneyt *et al.* 1996) ou le sidérotypage consistant en l'étude des siderophores des *Pseudomonas* spp. fluorescent productrices du sidérophore pyoverdine ont également été utilisés dans le but de les identifier (Meyer *et al.* 2007 ; Behrendt *et al.* 2009; Meyer 2010). La combinaison entre l'analyse multilocus et la spectrométrie de masse est aussi utilisé pour la discrimination entre les espèces du genre *Pseudomonas* (Mulet *et al.* 2012).

Dans le but d'identifier et de classer les huit isolats *Pseudomonas* spp. fluorescents antagonistes de *C. m. subsp. michiganensis* retenus lors de cette étude nous avons opté pour

une taxonomie polyphasique consistant d'abord en l'étude génotypique s'appuyant sur le séquençage des gènes de l'ARNr 16S et du *rpoB*. Ensuite, l'établissement des similitudes entre les isolats retenus et les espèces les plus proches à l'issue de l'analyse moléculaire a été poursuivie par une comparaison des caractères phénotypique reposant sur divers caractères morphologiques, culturels et biochimiques.

II- MATERIEL ET METHODES

Tout d'abord, afin de déterminer l'appartenance des huit isolats au genre *Pseudeomonas*, ils ont été observés au microscope et ont subi la coloration de Gram au grossissement (G×1000) (Annette *et al.* 1985). Parallèlement, les tests oxydase et la détermination de leur fluorescence par soumission des colonies aux rayons UV à 365 nm ont été également réalisés. Afin de s'assurer du caractère non pathogène des antagonistes retenus vis-à-vis des plantes, le test d'hypersensibilité sur feuilles de tabac a été réalisé comme décrit précédemment (chapitre II).

1- Identification génotypique

Les huit isolats bactériens retenus lors de cette étude (RN69, RN39e, RN58, RN130, RN42b, RN47e, RN63 et RN53b) ont été utilisés dans cette partie.

L'identification moléculaire a ciblé le séquençage du gène de l'ARNr 16S. Le deuxième gène est celui qui code pour la sous unité β de l'ARN polymérase *rpoB* (gène *rpoB*). Cette analyse a commencé par l'extraction de l'ADN bactérien et son amplification par la technique de PCR avant d'être terminée par le séquençage des amplicons purifiés selon la méthode de Sanger. Ces manipulations ont été réalisées au sein de la plate forme de Biologie Moléculaire et Génomique Fonctionnelle du CNRST de Rabat dans le cadre de l'UATRS.

1.1- Extraction de l'ADN bactérien

Extraction et obtention du lysat bactérien : L'extraction et la purification de l'ADN bactérien ont été réalisées avec le Kit « GenElute Bacterial Genomic DNA kit » (SIGMA, Aldrich) conformément au protocole du fournisseur. Pour se faire, 1,5 ml de cultures des 8 isolats bactériens dans le milieu liquide KB ont été centrifugés à 12 000 g pendant 2 mn. Le surnageant a été ensuite éliminé et le culot bactérien mis en suspension dans 180 ml de la solution de lyse T (B6678) fourni avec le Kit. 20 μ L de la solution Protéinase K ont été ajoutés à chaque échantillon et le tout a été mixé avant d'être incubé à 55°C pendant 30 min. Après incubation, 200 μ L de la solution de lyse C (B8803) ont été additionnés et l'ensemble a

été agité au vortex pendant 15s puis incubé à 55°C pendant 10min. il faut noter qu'une mixture homogène est essentielle pour une bonne lyse.

Purification de l'ADN : Le kit fournit des colonnes mini préparées et assemblées d'avances avec un anneau rouge. On ajoute dans chaque colonne 500 µL de la solution de préparation de la colonne (C2112) et on centrifuge à 12 000 g pendant une min. L'éluate est jeté. 200 µL d'éthanol (95-100 %) sont incorporés au lysat bactérien et l'ensemble a été homogénéisé par vortex pendant 5-10 secondes. L'obtention d'un mélange homogène est essentielle. Le lysat bactérien ainsi préparé est transféré dans la colonne préparée au préalable. Le tout est centrifugé à 6500 g pendant 1 min. Les tubes collecteurs (de 2ml) contenant les effluents sont jetés et les colonnes sont transférées dans de nouveaux tubes collecteurs puis on leur additionne 500 µl de la solution de lavage 1 (W0263). Une centrifugation à 6500 g pendant 1 min est ensuite réalisée. Les colonnes sont transférées dans de nouveaux tubes collecteurs et on procède à un deuxième lavage par ajout de 500 µl de la solution de lavage concentrée (B6553). Les mélanges sont centrifugés à une grande vitesse (12 000 g) pendant 3 min afin de sécher les colonnes. Ces colonnes séchées sont ensuite transférées dans de nouveaux tubes collecteurs et 200 µl de la solution d'élution (B6803) leur sont incorporées. Afin d'augmenter l'efficacité de l'élution de l'ADN on laisse incubé à la température ambiante pour 5 min. Une centrifugation à 6500 g pendant 1 min est ensuite faite. Une deuxième élution est entreprise de la même manière en utilisant le même tube collecteur afin d'augmenter le rendement de l'ADN récupéré. En effet il est indiqué sur le catalogue du kit que cette deuxième élution peut augmenter le rendement de 20 à 50%. L'éluate récupéré contient de l'ADN génomique pur. Il est stocké à court terme à 4°C. Pour un stockage à long terme on utilise d'un congélateur à -20 °C.

La concentration et la qualité de l'ADN génomique est déterminée par spectrophotométrie en utilisant le Nanodrop 8000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). L'ADN est dilué dans du tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 - 8,5) et l'absorbance est mesurée à 260 nm, 280 nm et 230 nm en utilisant des micros cuvettes à quartz. L'absorbance à 260 nm et à 280 nm doit être comprise entre 0,1 et 1,0. L'absorbance à 230 nm est utilisée pour corriger l'absorbance de fond. Une absorbance de 1,0 à 260 nm correspond à environ 50 µg ml⁻¹ d'ADN double brin. Les ratios A260/A280 et A260/A230 doivent être supérieur à 1,6.

1-2- Analyse des séquences de l'ADNr 16 S et *rpoB*

Amplification par PCR: L'ADN extrait est soumis à une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant deux amorces Fd1 et RP2 (Tableau IV.1). Ce couple d'amorces est utilisé pour amplifier le gène de l'ADNr 16S de la plupart des procaryotes (Weisburg *et al.*, 1991 ; Attitalla *et al.* 2007). Un autre couple d'amorces est utilisé pour amplifier le gène *rpoB* à savoir le PSF et le PTR/PAR (Sajben *et al.* 2011) (Tableau IV.1). Ces amorces sont utilisés pour amplifier une partie d'environ 400 pb de la région hypervariable du gène *rpoB* des *Pseudomonas* (Mollet *et al.* 1997 ; Adékambi *et al.* 2009; Sajben *et al.* 2011).

Tableau IV.1: Les amorces utilisées pour amplifier les gènes de l'ARNr 16S et du *rpoB* des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Oligonucléotide	Séquence (5'→ 3')	Position ARNr 16S E Coli	Tm	Référence
ARNr 16S : Fd1	AGAGTTTGACCTGGCTCAG	7 à 26	52°C	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
RP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	1513 à 1494	52°C	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
rpoB : PSF	AGTTCATGGACCAGAACAACC	-	58°C	Sajben <i>et al.</i> , 2011
PTR	CCTTGACGGTGAACCTCGTTC	-	58°C	Sajben <i>et al.</i> , 2011
PAR	CCTTCACGGTGAATTCGTTC	-	58°C	Sajben <i>et al.</i> , 2011

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 70 µl contenant les produits et les réactifs mentionnés dans le Tableau IV.2 en utilisant les amorces adéquates. Le Volume final étant de 70 µl.

Tableau IV.2 : Réactifs utilisés lors des réactions PCR

Mélange réactionnel	Quantité en µl
1. ADN pur (30 ng µl ⁻¹)	5 µl
2. Amorce (100 µM)	0,35 µl
3. dNTPs (10 mM)	5,6 µl
4. Tampon 10x	7 µl
5. MgCl ₂ (50 mM)	2,1 µl
6. Taq polymérase (5 U µl ⁻¹)	0,8 µl
7. H ₂ O	48,8 µl

Les réactions PCR ont été menées dans un thermocycleur (Verity, Applied Biosystems). Pour chaque réaction, le thermocycleur est programmé en suivant le cycle dénaturation-hybridation-élongation indiqué sur le Tableau IV.3.

Tableau IV.3 : Conditions des cycles de dénaturation-hybridation-élongation lors des réactions de la PCR

Cycle	Temps	Température °C	
Dénaturation initiale	4 minutes	96°C	
Dénaturation	10 secondes	96°C	
Hybridation	40 secondes	52°C (Fd1/RP2) 58°C	x 35 cycles
Elongation	2 minutes	72°C	
Dernière élongation	4 minutes	72°C	

Purification des produits de la PCR : Avant d'entamer le séquençage, nous avons procédé à une purification des produits de la PCR, par élimination des amorces et des nucléotides (dNTPs) non utilisés durant la réaction de PCR, avec le Kit ExoSAP-IT. Le mélange réactionnel est composé de 5 µl du produit de la réaction PCR et 2µl de l'ExoSAP-IT. La plaque de réaction a été incubée à 37°C pendant 15 min dans le thermocycleur pour dégrader les amorces et les nucléotides libres puis à 80°C pendant 15min, pour inactiver l'ExoSAP-IT. Le Produit PCR est alors prêt pour le séquençage. Ces produits PCR purifiés sont par la suite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% en présence d'un marqueur de poids moléculaire de 1kb. Les photos des gels ont été visualisées avec le système de photo documentation « **G Box** ».

Séquençage des gènes de l'ARNr 16S et du rpoB Le séquençage a été réalisé avec le Kit « BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing » (Applied Biosystems) conservé à -20°C. Ce Kit est un mélange qui contient la Taq polymérase, du tampon, des acides désoxyribonucléiques (dNTPs) et des acides didésoxyribonucléiques (ddNTPs) marqués (Applied Biosystems). Dans un tube eppendorf, un mélange réactionnel a été préparé par ajout des réactifs un par un, tout en respectant la quantité et l'ordre indiqué dans le Tableau IV.4.

Tableau IV.4 : Conditions de la réaction de séquençage.

Mélange réactionnel	Quantité en μl
1. Big Dye (Mix)	1 μl
2. Tampon de séquençage 5x	3 μl
3. Amorces	2 μl
4. ADN matrice	0.75 - 1.5 μl
5. H_2O (MiliQ)	2.5 - 3.25 μl
Volume final	10 μl

Le mélange réactionnel préparé a été transféré dans une plaque de réaction à 96 puits. Ensuite, la plaque a été chargée dans le thermocycleur programmé pour réaliser la réaction de séquençage dans les conditions indiquées sur le Tableau IV.5.

Tableau IV.5 : Conditions des cycles de dénaturation-hybridation-élongation lors du séquençage

Cycle	Temps	Température °C	
Dénaturation initiale	1 minute	96°C	
Dénaturation	10 secondes	96°C	
Hybridation	5 secondes	50°C	x 25 cycles
Elongation	4 minutes	60°C	

La purification de la réaction de séquence a pour but d'éliminer les sels, les ddNTPs, et les dNTPs non incorporés afin d'éviter leurs injection dans les capillaires de l'analyseur d'ADN. Après centrifugation de la plaque de réaction pendant une minute, les solutions suivantes ont été ajoutées dans chaque puits :

- 10 μl de la solution X Terminator du Kit qui capture les molécules non incorporées (les ddNTPs et les dNTPs) ainsi que les sels libres qui résultent de la réaction de séquence ;

- 45 µl de la solution SAM du même kit. Cette solution augmente la performance de la première solution tout en stabilisant l'échantillon séquencé après sa purification.

Ces deux solutions ont été préalablement agitées au vortex pendant 10 sec à vitesse maximale et gardés au frais dans des bacs remplis de glaces jusqu'à leur utilisation.

La plaque de réaction a été ensuite scellée avec un film adhésif et placée à 160°C pendant 2 secondes. Enfin, agitée au vortex à 1800 rpm pendant 30min. On doit noter que l'homogénéité du mélange réactionnel est vérifiée après chaque minute d'agitation par Vortex. la plaque de réaction ainsi préparée a été centrifugée à 1000g pendant 2 minutes dans une centrifugeuse à plaque. A ce stade, la plaque de réaction peut être soit conservée à 4°C pendant 10 jours, ou à -20°C au delà de 10 jours, soit utilisée pour le séquençage dans un séquenceur du type ABI 3130 xl Genetic Analyzer (Applied biosystems).

Le passage dans ce dernier nécessite de remplacer le film adhésif par le septa puis la plaque a été placée dedans. Les résultats collectés en utilisant le logiciel « data collection v3.0 » (Applied biosystems) ont été ensuite analysés avec le logiciel « sequencing analysis v 5.3.1 » (Applied biosystems). Les séquences obtenues (séquences sens (F) et anti-sens (R)) ont été ensuite assemblées par le programme « Contig Assembly Program (CAP) » (Huang, 1992). Les séquences résultantes, d'environ 1500 pb pour le gène de l'ARN 16S et de presque 400 pb pour le gène *rpoB* ont été alignées avec le logiciel BioEdit (Ink) grâce aux programmes ClustalW (Thompson *et al.* 1994). Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences disponibles dans les banques de données (NCBI, *GenBank*) à l'aide du programme Blastn (Altschul *et al.* 1997) qui nous a permis de dresser les arbres phylogénétiques des huit isolats *Pseudomonas spp.* fluorescents retenus.

2- Caractères phénotypiques

L'étude des activités biochimiques et physiologiques a été réalisée en utilisant la galerie API 20 NE (BioMérieux, France) (Figure IV.1). Ces caractères ont été comparés avec ceux des bactéries les plus proches selon l'analyse de l'ARNr 16S. D'autres caractères liés à la sensibilité des isolats à divers concentrations de NaCl, leur croissance à divers pH ont aussi été analysés.

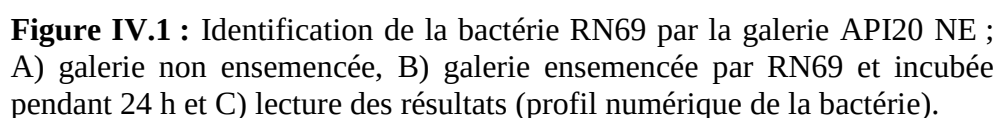
Caractères biochimiques (galerie API 20 NE) : La galerie API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bactéries Gram négatif non entérobactéries comme les *Pseudomonas spp.* Cette galerie comporte huit tests conventionnels liés à l'activité de divers enzymes (Nitrate réductase ou dénitrification, tryptophanase ou formation de l'indole à partir

du tryptophane, fermentation du glucose, Arginine déshydrogénase ou formation de l'ammoniac à partir de l'arginine, uréase, Esculinase, gélatinase ou liquéfaction de la gélatine et la β -galactosidase) et 12 tests d'assimilation de sucres (Glucose, Arabinose, Mannose, Mannitol, N-acétyl-D glucosamine, Maltose, Gluconate, Caprate, Adipate, Malate, Citrate et Phényl-acétate). A ces tests le 21^{ème} test s'ajoute, il s'agit de la recherche du cytochrome oxydase ou test de l'oxydase) (Tableau IV.6).

Tableau IV.6 : Les tests de la galerie API20 NE

Tests	Sigle
réduction des Nitrates en nitrites et/ou Azote (Dénitrification)	NO ₃
Tryptophanase	TRP
Fermentation du Glucose	GLU
Arginine DiHydrolase	ADH
Uréase	URE
Esculinase (β -glucosidase)	ESC
Gélatinase	GEL
β -galactosidase	PNPG
Utilisation de sucres comme source de carbone	
Glucose	GLU
Arabinose	ARA
Mannose	MNE
Mannitol	MAN
N-acétyl-D glucosamine	NAG
Maltose	MAL
Gluconate	GNT
Caprate	CAP
Adipate	ADI
Malate	MLT
Citrate	CIT
Phényl-acétate	PAC
Test supplémentaire N° 21	
Oxydase (cytochrome-oxydase)	OX

Des cultures jeunes (18 à 24 h) des bactéries à identifier ont été préparées sur milieu de culture TSA en boîte de Pétri. Une à quatre colonies est utilisée pour la préparation d'une suspension bactérienne de turbidité égale à 0.5 de Macfarland dans 2 ml de l'eau physiologique stérilisé (en ampoule fournie avec la galerie). Les tubes des huit tests conventionnels (du test NO₃ au test PNPG) sont remplis avec les suspensions déjà préparées en utilisant une pipette jetable de 1 ml. Pour les autres tests (Glu à PAC), un volume de 200 μ l des suspensions ont été mélangées au milieu API AUX (fourni en ampoule avec la galerie) et



III- RESULTATS ET DISCUSSION

L'observation microscopique des huit isolats a permis de distinguer des cellules bactériennes allongées sous forme de bacilles à Gram négatif (Gram-). Ces bactéries sont oxydase positive. Ce qui confirme leur appartenance au genre *Pseudomonas*. Tous les isolats sont fluorescents sous UV à 365 nm. Cette fluorescence varie du jaune vers le jaune verdâtre (Figure IV.2). Aucune de ces bactéries n'a induit de réaction d'HS sur les feuilles de tabac (Figure IV.3).



Figure IV.2 : fluorescences de quatre Isolats *Pseudomonas* spp. Observés sous une lumière UV à 365 nm.

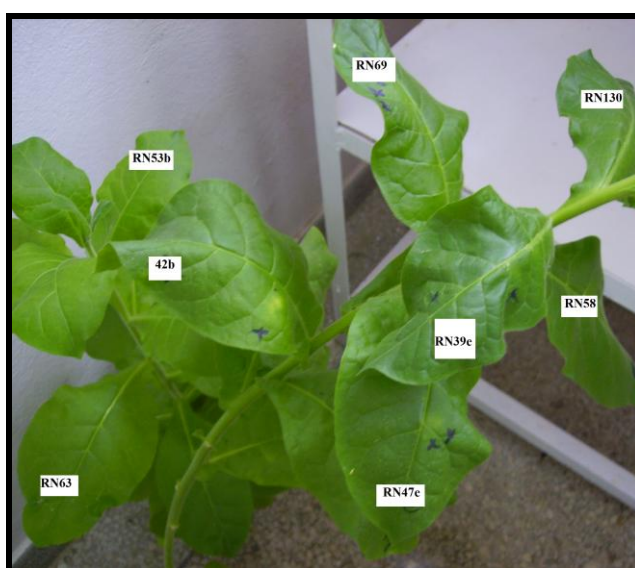


Figure IV.3 : Réactions négatives d'hypersensibilité sur feuilles de tabac.

1- Identification génotypique des huit isolats sélectionnées

Le **tableau IV.7** montre les résultats du dosage de l'ADN extrait des huit isolats bactériens avec le Nanodroop. La qualité de l'ADN est jugée bonne et les quantités obtenues sont largement suffisantes pour les études qui suivront. En effet, les ratios A260/A280 et A260/A230 dépassent largement le seuil requis de 1.6.

Tableau IV.7 : Concentrations des échantillons d'ADN extraits des isolats bactériens. Concentrations estimées avec le Nanodroop 8000.

Isolats bactériens	Ratio A260/A280	Ratio A260/230	Quantité de l'ADN (ng/μl)
RN 58	1,91	2,21	42,17
RN 63	1,98	2,59	160,8
RN 69	1,88	2,25	103,7
RN 130	1,97	3,08	73,10
RN 39e	1,92	2,38	169,5
RN 42b	1,94	2,88	51,86
RN 47e	1,74	2,19	217,9
RN 53b	1,94	2,58	104,7

Après amplification des gènes de l'ARNr 16S et du *rpoB* avec les amorces universelles, les produits purifiés de la PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% et les gels sont photographiés et visualisés avec le système de photo documentation « **G Box** ». Les huit isolats ont donné la bande de 1500pb de l'ARNr 16S et celle de 400pb du *rpoB* (Figure IV.4). Les bandes sont indiquées par des flèches sur la figure.

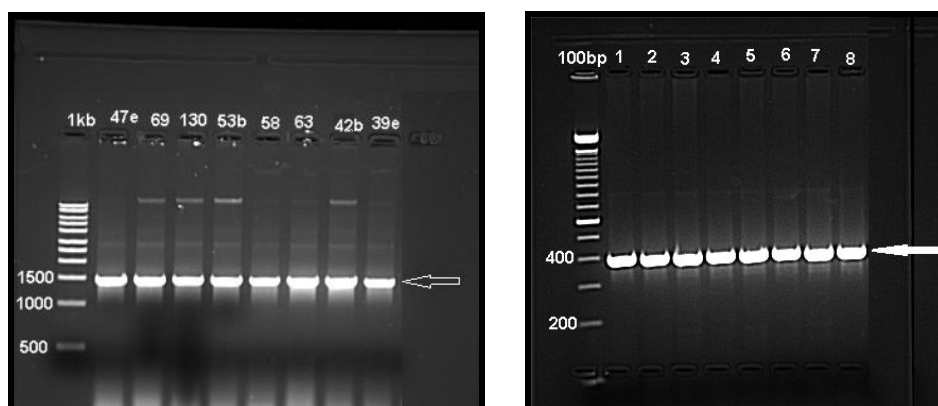


Figure IV.4 : Electrophorèse des produits de la PCR sur gel d'agarose 1%. Les flèches indiquent les bandes de 1500 kb de l'ARN 16S et celle de 400 pb polymérisées chez les huit isolats étudiés.

Les séquences obtenues pour les deux gènes ont été comparées avec celles de la banque de données (*GenBank*) et les arbres phylogéniques ont été dressés. Le tableau IV.8 présente les espèces les plus proches des huit isolats en se basant sur les séquences de l'ARNr 16S. Les figures IV.5 (a, b, c, d, e) montrent des exemples d'arbres phylogéniques de ces isolats.

Tableau IV.8 : Similarité des séquences de l'ARNr 16S des huit *Pseudomonas* spp. fluorescents, aux séquences des espèces les plus proches.

Isolat	Longueur des fragments (pb)	Nombre d'espèces avec un % de similarité >98%	Espèces les plus proches	
			Nom de l'espèce	Similarité (%)
RN39e	1480	15	<i>P. azotoformans</i>	99.01
			<i>P. libanensis</i>	99.00
			<i>P. gessardii</i>	98.93
			<i>P. lurida</i>	98.55
			<i>P. poae</i>	98.39
RN42b	1475	1	<i>P. plecoglossicida</i>	100
RN 47e	1477	16	<i>P. azotoformans</i>	99.89
			<i>P. libanensis</i>	99.62
			<i>P. synxantha</i>	99.31
			<i>P. poae</i>	98.93
			<i>P. proteolytica</i>	98.77
RN 53b	1476	2	<i>P. plecoglossicida</i>	98,85
			<i>P. monteilii</i>	98,01
RN 58	1476	15	<i>P. azotoformans</i>	99.9
			<i>P. libanensis</i>	99.2
			<i>P. gessardii</i>	99.1
			<i>P. synxantha</i>	99.1
RN 63	1475	2	<i>P. azotoformans</i>	98,98
			<i>P. libanensis</i>	98,97
RN 69	1481	2	<i>P. plecoglossicida</i>	98.05
			<i>P. monteilii</i>	98.01
RN 130	1476	17	<i>P. plecoglossicida</i>	99.95
			<i>P. monteilii</i>	99.80
			<i>P. putida</i>	99.80
			<i>P. mosselii</i>	99.50
			<i>P. oryzihabitans</i>	99.40

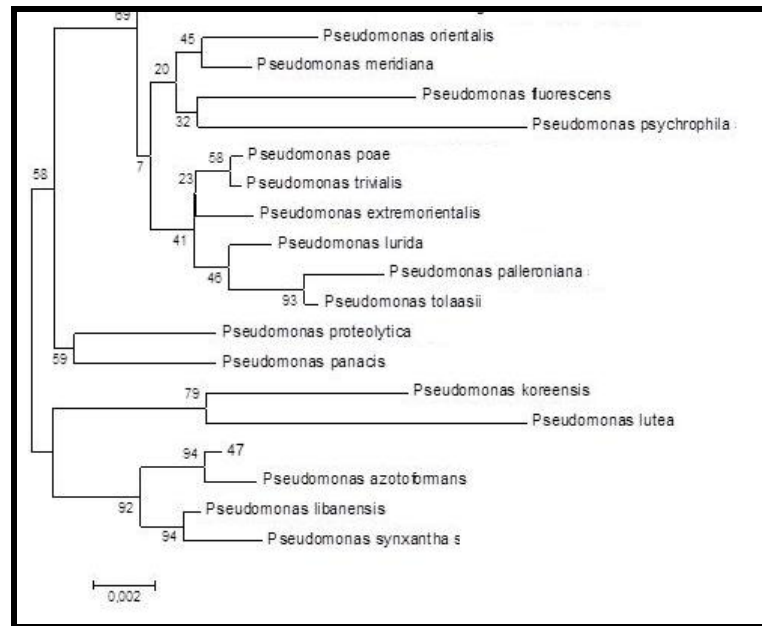


Figure IV.5 a: Arbre phylogénique de l'isolat RN47e.

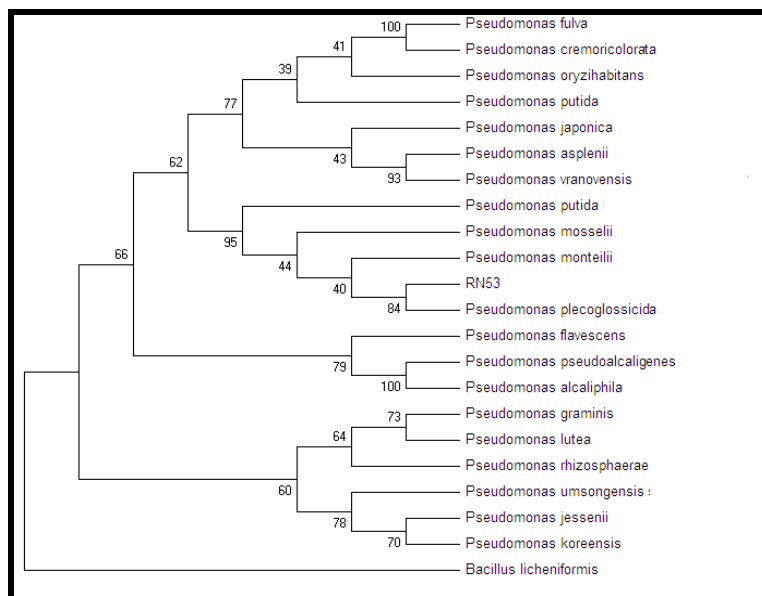


Figure IV.5 b: Arbre phylogénique de l'isolat RN53b basés sur l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S.

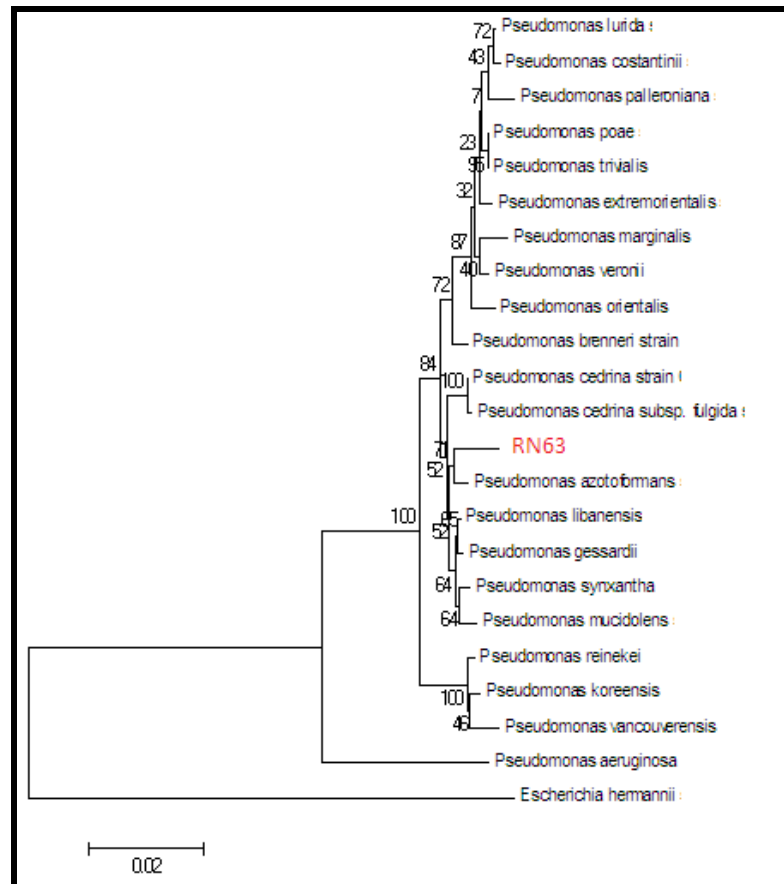


Figure IV.5 c: Arbre phylogénique de l'isolat RN63 basés sur l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S.

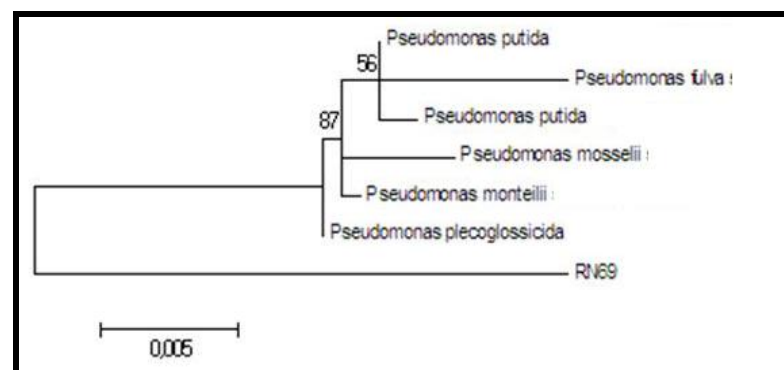


Figure IV.5 d: Arbre phylogénique de l'isolat RNe 69 basés sur l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S.

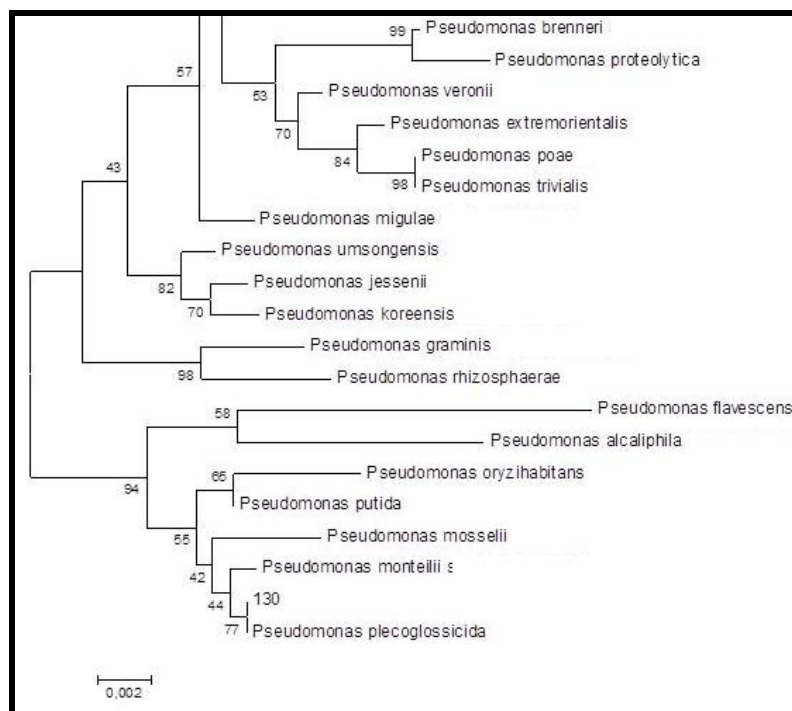


Figure IV.5 e : Arbre phylogénique de l'isolat RN130 basés sur l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S.

Il est admis que lorsqu'il existe moins de 97% d'homologie entre les séquences des gènes de l'ARNr 16S de deux isolats bactériens, ces derniers appartiennent à des espèces différentes (Stackebrandt et Goebel, 1994). Les taxonomistes ont proposé l'utilisation des pourcentages d'homologie pour affilier des souches bactériennes au même groupe taxonomique (genre ou espèce). Ces pourcentages d'homologie arbitraires ont été fixés à :

- ✓ $\geq 97\%$ pour classer un microorganisme dans un genre ;
- ✓ et $\geq 99\%$ pour le classer dans une espèce (Stackebrandt *et al.*, 2002, Reller *et al.*, 2007)

Dans le cas des huit isolats étudiés, les pourcentages de similarités des séquences ARNr 16S comparés à celles de diverses espèces appartenant à plusieurs genres de la base de données Genbank permet de confirmer qu'ils appartiennent tous au genre *Pseudomonas* ($\geq 97\%$). Ces résultats montrent aussi qu'ils sont très proches d'espèces présentes dans cette base de données (Tableau IV.8). Comme le montrent les pourcentages de similitudes supérieures à 97% représentés dans ce tableau, les huit bactéries présentent de très hauts degrés de similitudes avec plusieurs espèces de *Pseudomonas*. Les taux les plus élevés sont

présentés avec deux espèces : *P. azotoformans* et *P. plecoglossicida*. Selon ces résultats, nos isolats pourraient donc être divisés en deux groupes :

- Les isolats RN39e, RN47e, RN58, RN63 sont très proches de *P. azotoformans*.
- Les isolats RN42b, RN53b, RN69, RN130 sont très proches de *P. plecoglossicida*.

Toutefois, à l'exception de l'isolat RN42b qui présente un degré de similitude de 100% avec *P. plecoglossicida*, les valeurs de similitudes supérieures ou égales à 97% ne permettent pas de les identifier avec précision. Les huit bactéries peuvent appartenir à l'une des espèces qui leur sont les plus proches. Dans le cas où des bactéries sont très proches, les analyses de l'ARNr 16S ne peuvent suffire pour une identification précise (Fox *et al.* 1992) et doivent être complétées par d'autres méthodes plus discriminatoires. L'hybridation ADN-ADN entre chacun de nos isolats et les espèces qui lui sont proches -technique très onéreuse et fastidieuse- et/ou d'autres séquençages de gènes comme le gène codant pour la sous unité β de l'ARN polymérase *rpoB* (gène constitué de 3411 à 4185 pb) permettrait de trancher (Wayne *et al.* 1987). Ait Tayeb *et al.* 2005, ont montré que l'analyse du gène *rpoB* permet de générer des arbres phylogéniques trois fois plus précis que ceux de l'ARNr 16 S. D'autre part, Adékambi *et al.* 2008 ont utilisé la séquence partielle (1100 pb) de ce gène et ont montré qu'il existe une corrélation entre le pourcentage l'hybridation ADN/ADN à partir du pourcentage de similitude du gène *rpoB*. Sajben *et al.* 2011 ont utilisé une séquence partielle (400pb) de ce gène pour étudier la phylogénie des isolats bactériens du genre *Pseudomonas*. L'analyse des séquences *rpoB* des 8 isolats confirment ceux de l'analyse du gène ARN r16 S. Le tableau IV.9 présente les résultats obtenus. Les Figures IV.6 (a, b, c, d) représentent des exemples d'arbres phylogéniques de quatre isolats basés sur les séquences *rpoB*.

Tableau IV.9 : Similarité des séquences du gène *rpoB* des huit isolats *Pseudomonas* aux séquences des espèces les plus proches.

Isolat	Espèce	% de similarité
RN39e	<i>P. azotoformans</i>	94,40
RN42b	<i>P. plecoglossicida</i>	94.30
RN47e	<i>P. azotoformans</i>	96.00
	<i>P. proteolytica</i>	97.00
RN53b	<i>P. plecoglossicida</i>	95.00
RN58	<i>P. azotoformans</i>	94.50
RN63	<i>P. azotoformans</i>	94.00
RN69	<i>P. plecoglossicida</i>	95.00
	<i>P. monteilii</i>	96.00
RN130	<i>P. plecoglossicida</i>	94.30
	<i>P. monteilii</i>	95.30

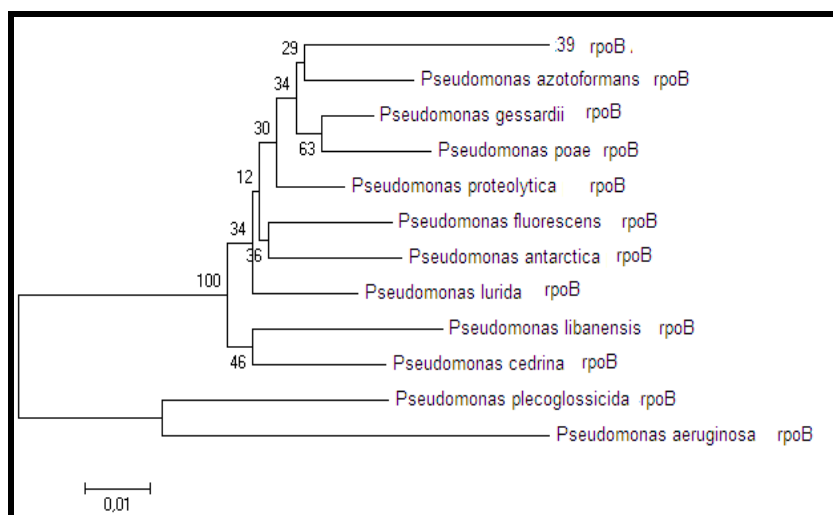


Figure IV.6 a: Arbre phylogénique de l'isolat RN39e basé sur l'analyse des séquences du gène *rpoB*.

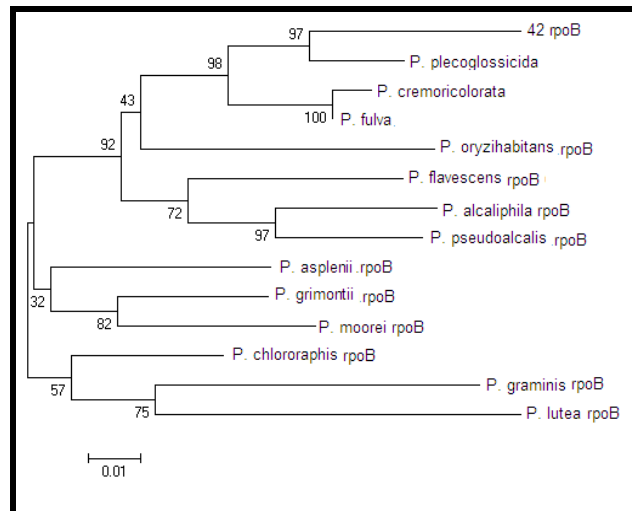


Figure IV.6 b: Arbre phylogénique de l'isolat RN42b basés sur l'analyse des séquences du gène *rpoB*.

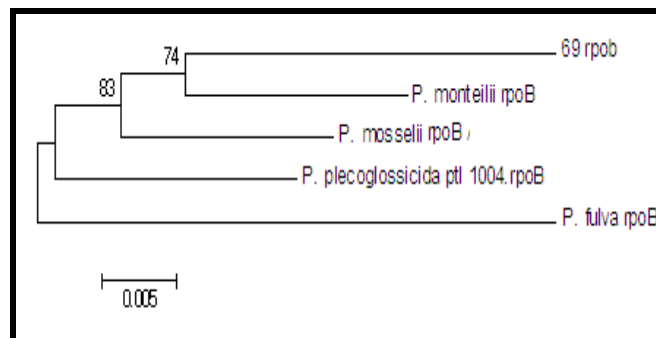


Figure IV.6 c: Arbre phylogénique de l'isolat RN69 basés sur l'analyse des séquences du gène *rpoB*.

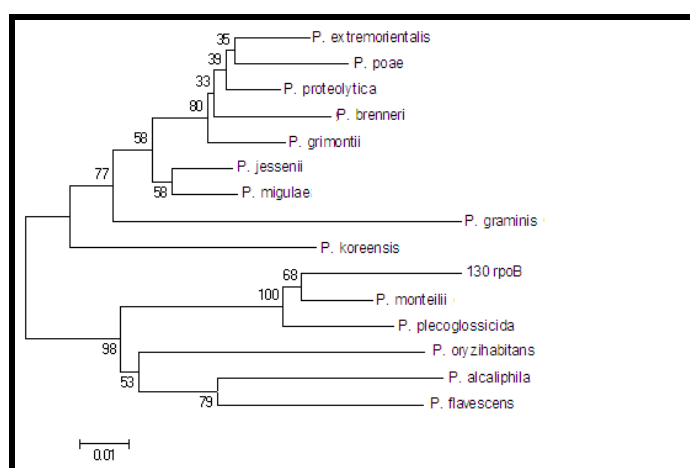


Figure IV.6 d: Arbre phylogénique de l'isolat RN130 basés sur l'analyse des séquences du gène *rpoB*.

A partir de ces résultats on peut conclure que les isolats peuvent être divisés en deux groupes :

-Groupe1 : identification complète par les analyses du gène ARNr 16 S et du gène *rpoB*. Il s'agit des isolats :

- RN39e, RN58 et RN63 sont identifiés comme étant des souches de l'espèce *P. azotoformans*.
- RN42b, RN53b sont identifiés comme étant des souches de l'espèce *P. plecoglossicida*.

-Groupe 2 : identification non précise par ces analyses et nécessite d'autres analyses tels que la comparaison des séquences de l'ADN total. Il s'agit de :

- L'isolat RN47e qui est apparenté à *P. azotoformans* et à *P. proteolytica* avec des pourcentages de similarités *rpoB* de 96.0 et 97.0% respectivement
- L'isolat RN 69 apparenté à *P. plecoglossicida* et à *P. monteilli* avec des pourcentages de similarités *rpoB* de 95% et 96.0% respectivement.
- L'isolat RN 130 apparenté à *P. plecoglossicida* et à *P. monteilli* avec des pourcentages de similarités *rpoB* de 94.8% et 95.30% respectivement.

Le tableau IV.10 suivant résume les résultats des analyses ARN16S et *rpoB* de ces derniers isolats dont l'appartenance précise n'est pas encore définie.

Tableau IV.10 : Résumé de l'analyse des gènes de l'ARNr 16S et du *rpoB* des isolats RN47, RN69 et RN130.

Isolat	Espèce apparenté	% de Similarité ARNr 16 S	% de Similarité <i>rpoB</i>
RNe 47	<i>P.azotoformans</i>	99.89	96.00
	<i>P. proteolytica</i>	98.77	97.00
RN69	<i>P. plecoglossicida</i>	98.05	95.00
	<i>P. monteilli</i>	98.01	96.00
RN130	<i>P. plecoglossicida</i>	99.95	94.30
	<i>P. monteilli</i>	99.80	95.30

2- Caractères phénotypiques des huit isolats sélectionnés

Le tableau IV.11 présente les résultats de certains caractères phénotypiques des huit isolats obtenus par la galerie API 20 NE. Il faut signaler que la galerie API20N est utilisée comme système d'identification. Cependant, une différence significative est relevée lors de la comparaison des résultats de l'identification des isolats avec les galeries API 20 NE et les méthodes moléculaires utilisées lors de cette étude. Cette différence peut être expliquée par le fait que ces systèmes sont adaptés à la caractérisation des *Pseudomonas* non cliniques (environnementaux) et non pas à leur identification (Behrendt *et al.* 1999 ; Peix *et al.* 2009). En effet, ces systèmes peuvent identifier des bactéries NE comme les *Pseudomonas* spp. (Barr *et al.* 1989 cité par Peix *et al.* 2009) appartenant à l'espèce *P. aeruginosa* et quelques unes appartenant à l'espèce *P. fluorescens* qui sont fréquemment isolées des spécimens cliniques. Cependant, ils n'arrivent pas à identifier les isolats collectés dans divers milieux environnementaux (sol, eau, mer,...). Ces limites sont dues d'une part au nombre limité de tests inclus dans ces galeries API et d'autres parts au fait que la plupart des nouvelles espèces décrites ne figurent pas dans la base de données de ces galeries. Cette base ne contient d'ailleurs que les espèces cliniques et pathogènes (Peix *et al.* 2003 ; Behrendt *et al.* 1999). Dans cette étude, elle ne peut à elle seule suffire pour identifier nos isolats et a plutôt un intérêt dans la caractérisation phénotypique des huit isolats sélectionnés. Ainsi, les tests de la galerie ont été utilisés afin de dresser un profil phénotypique de chaque isolat. En effet, les taxonomistes préconisent l'utilisation d'un ensemble des caractères phénotypiques additionnées à l'analyse génotypique dans le cadre d'une taxonomie polyphasique (Vandamme *et al.* 1996 ; Stackebrandt *et al.* 2002 ; Palleroni, 2005, Palleroni, 2010).

Tableau IV.11-a: Caractères phénotypiques déterminés par la galerie API 20NE de quatre isolats proches l'espèce *P. azotoformans*.

Isolats	RN39e	RNe47	RN58	RN63	<i>P. azotoformans</i> *
Caractères					
Dénitrification	+	+	+	+	-
Tryptophanase	-	-	-	-	-
Fermentation du Glucose	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase (ADH)	-	+	+	+	+
Uréase	-	-	-	-	-
Esculinase	+	-	-	-	-
Gélatinase	+	+	-	-	-
β -galactosidase	+	-	-	-	-
Assimilation de :					
Glucose	+	+	+	+	-
Arabinose	-	-	+	+	-
Mannose	+	+	+	+	-
Mannitol	+	+	+	+	-
N-acétyl-D glucosamine	+	+	+	+	-
Maltose	-	-	+	+	-
Gluconate	+	+	+	+	+
Caprate	+	+	+	+	-
Adipate	+	-	-	-	+
Malate	+	+	+	+	-
Citrate	+	+	+	+	-
Phényl-acétate	+	+	-	-	-
Autres tests :					
Oxydase	+	+	+	+	+
Pigments fluorescents	+	+	+	+	+

* : Park *et al.* 2005.

Tableau IV.11-b: Caractères phénotypiques déterminés par la galerie API 20NE de quatre isolats proches de l'espèce *P. plecoglossicida*.

Isolats	RN42b	RN53b	RN69	RN130	<i>P. plecoglossicida</i> *
Réactions					
Dénitrification	+	+	-	-	-
Tryptophanase	-	-	-	-	-
Fermentation du Glucose	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+
Uréase	-	-	-	+	+
Esculinase (β glucosidase)	+	-	-	+	-
Gélatinase	-	+	-	+	-
β -galactosidase	-	-	-	-	-
Assimilation de :					
Glucose	+	+	+	+	-
Arabinose	+	+	+	-	-
Mannose	+	+	+	-	-
Mannitol	+	+	-	-	-
N-acétyl-D glucosamine	+	+	-	+	-
Maltose	-	-	-	+	-
Gluconate	+	+	+	+	+
Caprate	+	+	+	-	-
Adipate	-	-	-	+	-
Malate	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+
Phényl-acétate	-	+	-	+	+
Autres tests :					
Oxidase	+	+	+	+	+
Pigments fluorescents	+	+	+	+	+

* : Nishimori *et al.* 2000.

IV- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, on peut dire que le système racinaire des plants de tomate prélevés dans la région de Souss-Massa-Draa est riche en *Pseudomonas* spp. fluorescents antagonistes de *C. m. subsp. michiganensis*. Les huit isolats de bactéries fluorescentes qui ont montré l'effet le plus important en biocontrôle de la maladie du chancre bactérien obtenus lors de ce travail sont non pathogènes aussi bien pour les plantes que pour l'homme. L'identification des ces isolats s'est basée sur l'analyse des séquences du gène ARNr 16S. Les résultats obtenus ont été confirmés pour cinq de ces isolats par les résultats du séquençage du gène *rpoB*. Sauf trois bactéries (RN47, RN69 et RN130) pour lesquelles l'identification précise nécessiterait de mener des expériences d'hybridation ADN-ADN. Les cinq isolats bactériens identifiés sont apparentés à deux espèces ; *P. azotoformans* (isolats RN39e, RN58, RN 63) et *P. plecoglossicida* (isolats RN42b, RN53b). Il faut noter néanmoins, que ces isolats bactériens diffèrent entre eux par certains caractères phénotypiques et peuvent être considérés comme des souches des espèces auxquels ils sont apparentés. L'hybridation ADN-ADN de ces isolats avec les souches types des espèces similaires permettrait de confirmer définitivement leur identité ou de les décrire comme nouvelles espèces à intérêt biotechnologique. Il faut aussi signaler que récemment, d'autres méthodes peuvent être utilisées pour atteindre le même but (Hilario *et al.* 2004, Ait Tayeb *et al.* 2005). Il s'agit d'analyses moléculaires visant d'autres gènes à intérêt taxonomique tel que *Opr1* (gène des lipoprotéines majeures de la membrane externe), *gyrB* (gène de la *gyrase B*), *rho* (gène du facteur rho), le facteur σ^{70} (gène *rpoD* de l'ARN polymérase) et *recA* (gène de la recombinaison A). En perspectives, l'hybridation ADN/ADN de nos isolats avec les souches types des espèces proches sont programmées comme suite logique à leur l'identification. On envisage aussi d'élargir la caractérisation moléculaire à d'autres gènes à fin d'avoir une MLSA complète de nos isolats. Un séquençage du génome complet des meilleurs isolats antagoniste est aussi envisageable. Ceci dans le but de disposer d'espèces dont l'identité est bien précises pour toute utilisation agrobiologique et/ou biotechnologique.

CHAPITRE V

**Utilisation des plantes aromatiques et
médicinales comme moyen de contrôle
du chancre bactérien de la tomate**

I. Introduction

Les semences de tomate récoltées et destinées à la commercialisation sont soumises à une extraction par voie acide suivie d'un traitement à l'hypochlorite de sodium (NaClO). Par la suite, des échantillons sont soumis à des tests microbiologiques afin de détecter la présence de *C. m. subsp. michiganensis* en adoptant les méthodes les plus récentes recommandées par l'ISHI (SPN-B004 version 9) (<http://www.worldseed.org>) ou Naktuinbouw (<http://www.naktuinbouw.nl/node/1415>) (Anonyme, 6). En juin 2011, un nouveau système international de prévention contre les agents pathogènes a été mis en place par les professionnels de la production des semences et des plants de tomate. Il s'agit du GSPP (Good Seed and Plant Practices). Le but de ce système est de veiller sur la diffusion des bonnes pratiques appliquées aux semences et aux plants de tomates destinées à la plantation. Cependant, malgré toutes ces mesures phytosanitaires la dissémination des bactéries pathogènes de quarantaine (EPPO, 2004) n'a pas été complètement maîtrisée. Etant donné que les semences sont la principale source de transmission de cette bactérie, tout programme de lutte doit donc commencer par l'obtention de semences certifiées indemnes de ce pathogène et qui ont en outre une bonne aptitude à la germination (Xu, 2010 ; Xu *et al.* 2010). C'est dans ce cadre que Tobias *et al.* (2007) ont testé l'effet de différents traitements sur les semences de tomate dans le but de contrôler trois bactéries pathogènes dont *C. m. subsp. michiganensis*. Les traitements en question sont des alternatives aux produits chimiques usuels qui ne sont plus utilisés dans les systèmes de production dits écologiques (Tobias *et al.* 2007). Il s'agit de plusieurs types de vinaigre, du carbonate de sodium hydrogéné (NaHCO₃) et de quelques huiles essentielles. L'agent du chancre bactérien paraît être sensible à tous les traitements utilisés excepté le NaHCO₃. Quant à la capacité germinative des semences, elle n'a pas été affectée par les vinaigres alors que les huiles essentielles l'ont significativement diminuée. Wruck *et al.* (2006) ont comparé l'effet de plusieurs traitements sur la viabilité de *C. m. subsp. michiganensis* sur pieds de bambou inoculés artificiellement. Les résultats obtenus par ces chercheurs ont montré que l'utilisation de l'hypochlorite de sodium à 2% pendant 30 mn était plus efficace que la solarisation et la fumigation avec des produits chimiques. Dans le cadre de la lutte biologique, l'utilisation des extraits des plantes aromatiques et médicinales comme traitements des semences s'avère très prometteuse. En effet, Daferera *et al.* (2003) ont testé l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de plusieurs plantes aromatiques contre des pathogènes de plantes. Les résultats obtenus par ces auteurs ont montré que *C. m. subsp. michiganensis* est très sensible aux huiles essentielles du

thym et de l'origan. Blaestra *et al.* (2009) ont évalué l'activité antibactérienne *in vitro* et *in vivo* des extraits aqueux de deux plantes médicinales, *Allium sativum* et *Ficus carica*, contre des agents pathogènes de la tomate dont celui du chancre bactérien. Les effets obtenus étaient très satisfaisants puisque les extraits d'*Allium sativum* et de *Ficus carica* ont permis de contrôler cette bactériose à des taux pouvant aller, respectivement, jusqu'à 65% et 38%, en comparaison avec un traitement standard à base de cuivre (Balestra *et al.* 2009). Actuellement, Kasselaki *et al.* 2011 ont rapporté un manque de traitements efficaces de semences contre les bactéries pathogènes. En effet, les composés à base de cuivre (les seuls traitements chimiques autorisés en vertu des normes de l'agriculture biologique) ne fournissent qu'un contrôle partiel. Gaufo *et al.* (2008) rapportent l'efficacité des extraits des plantes originaires du Camerone envers l'agent du mildiou de la tomate. Récemment, Ravikumar et Garampalli (2013) ont prouvé que les extraits aqueux de 13 plantes parmi les 39 qu'elles ont utilisées ont une activité antifongique intéressante envers *Alternaria solani*. Ces extraits peuvent donc être utilisés comme fongicides potentiels en culture organique de tomate (Ravikumar et Garampalli, 2013). Boulogne *et al.* 2012 rapportent dans leur revue l'utilisation potentielle des métabolites extraits des plantes comme antifongiques et insecticides.

Le but de cette étude était la recherche des traitements alternatifs pour le contrôle du chancre bactérien de la tomate (causé par *C. m. subsp. michiganensis*), une maladie bactérienne transmise par les semences. Dans ce chapitre nous avons évalué l'activité antibactérienne de plusieurs plantes aromatiques et médicinales (PAM) originaires du Sud Marocain. Les volets que nous avons abordés concernent :

- Le screening et la sélection de plantes aromatiques et médicinales (PAM) sur la base de l'activité antibactérienne de leur extrait aqueux contre *C. m. subsp. michiganensis*.
- La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB) des meilleurs extraits.
- L'évaluation de l'effet des meilleurs extraits aussi bien sur la germination des graines de tomate que sur l'agent pathogène.
- Le screening phytochimique des meilleures PAM par chromatographie sur couche mince (CCM) et le dosage des phénols totaux et des flavonoïdes ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits.

II. Matériel et méthodes

1- Prospection et collecte du matériel végétal

Des sorties de prospection et de collecte des plantes ont été réalisées durant les années 2006, 2007 et 2008. Trois axes ont été choisis : Biougra-Taфраout, Tanalt-Aït Baha et Taфраout-Tiznit. Les espèces récoltées sont placées dans des sacs en plastique propres et numérotés. Au laboratoire, les échantillons sont séchés à l'abri de la lumière et de l'humidité durant une semaine ensuite, ils sont soumis à un séchage à l'étuve à 35°C pendant 24h.

2- Préparation des extraits aqueux

Après séchage, les différentes parties disponibles des plantes sont broyées à l'aide d'un broyeur type Moulinex afin d'obtenir une poudre. 20 grammes de cette poudre sont mis en suspension dans 60 ml d'eau distillée. Le tout est porté à ébullition pendant 5 minutes. Ensuite, on procède à une double filtration sur la gaze puis sur papier filtre (Wathman numéro 1). Le filtrat obtenu est séché à l'étuve à 60 °C afin d'obtenir un résidu sec. Par la suite, une solution mère de concentration égale à 50 mg ml⁻¹ (5%) a été préparée dans de l'eau distillée stérile pour chaque plante (Ali-Emmanuel *et al.* 2002).

3-Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits de plantes

3.1- Préparation des cultures bactériennes

Une suspension de *C. m. subsp. michiganensis*, isolat Cmm H195, est préparée dans de l'eau physiologique stérile à partir d'une jeune culture de 72h sur milieu NBY. La densité optique de la suspension bactérienne est ajustée à 0,46 (10⁸UFC ml⁻¹) (Umesha, 2006). Un volume de 0,1 ml de la suspension est étalé, d'une manière homogène, sur la surface du milieu de culture à l'aide de billes de verre stériles. Les boîtes, ainsiensemencées, sont placées dans un incubateur à 25°C pendant 30 min.

3.2- Activité antibactérienne *in vitro*

L'évaluation, *in vitro*, de l'activité antibactérienne des extraits aqueux des plantes a été réalisée sur la base du calcul de la moyenne des zones d'inhibition de la croissance *C. m. subsp. michiganensis*. Pour ce faire, des disques de papier filtre (Wathman n°3) stériles de 5 mm de diamètre sont imprégnés par un volume de 10 µl de chaque extrait de plante. Par la suite, les disques sont déposés dans les boîtes de Pétri précédemmentensemencées par *C. m. subsp. michiganensis* Cmm H195, à raison de 5 disques par boîte. Après 72 h d'incubation à

25°C, on procède à la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques. Une répétition de trois boîtes de Pétri par plante a été réalisée.

4- Détermination des CMI et des CMB

4.1- Détermination des CMI

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits aqueux sont déterminées en milieu liquide selon la méthode décrite par Schaad *et al.* (1995) légèrement modifiée. Dans des tubes à hémolyse contenant un bouillon nutritif, on prépare une série de dilution au ½ dans un intervalle de concentration allant de 50 à 3,125 mg ml⁻¹ à partir d'une concentration initiale de 50 mg ml⁻¹ d'extrait aqueux de plantes. Les tubes sontensemencés, par la suite, avec 10 µl d'une suspension de *C. m. subsp. michiganensis* (10⁸ UFC ml⁻¹) Cmm H195. Un témoin sans extrait est réalisé. Les tubes, ainsi préparés, sont incubés à 25°C pendant 24h. La concentration qui ne montre aucune croissance, visible à l'œil nu, de l'agent pathogène est retenue comme correspondant à la CMI. Trois répétitions sont réalisées pour chaque extrait et l'expérience est répétée deux fois.

4.2- Détermination des CMB

Les concentrations minimales bactéricides (CMB) sont déterminées en étalant 10µl, prélevés à partir des tubes n'ayant montré aucune croissance bactérienne visible, sur milieu de culture NBY (correspondant à la CMI). Le pourcentage de germes viables est estimé par comparaison avec des témoins réalisés avec une gamme de dilutions décimales de concentrations bactériennes comprises entre 100 % et 0,01 %. Un volume de 10 µl de chaque dilution est étalé sur milieu de culture NBY. Les cultures, ainsi réalisées, sont incubées à 25°C pendant 72 heures. La CMB, qui correspond à la concentration de l'extrait de plante ne permettant que 0,01 % de survie de l'inoculum initial (Moroh *et al.* 2008), est estimée en comparant le nombre des colonies apparues à celui de la gamme des dilutions décimales réalisées. Trois répétitions sont réalisées pour chaque extrait et l'expérience est répétée deux fois.

5- Effet des extraits aqueux sur la population du pathogène à la surface des semences

Des semences de tomate var. Clause 27 (France) sont artificiellement inoculées par une suspension bactérienne de l'isolat Cmm H195 du pathogène à 10⁸ UFC ml⁻¹. Pour ce faire, les semences sont mélangées avec la suspension de l'agent pathogène additionnée de méthyle cellulose (2%) comme substance adhésive à raison d'un gramme de semences par 10 ml du mélange. Le mélange est mis sous agitation pendant une heure puis les semences sont séchées

sous une hôte à flux laminaire pendant une nuit. Les semences, ainsi inoculées, sont trempées dans les extraits aqueux (5%) des huit meilleures PAM à raison de 20 graines par extrait et le mélange est laissé sous agitation pendant une heure. Après séchage, des échantillons de 5 graines par traitement sont pris au hasard pour le dénombrement de l'agent pathogène. Trois répétitions sont réalisées pour chaque extrait. Un témoin est réalisé de la même manière avec des semences inoculées et non traitées par les PAM. Les résultats du dénombrement sont exprimés en log UFC par graine.

6- Effet des meilleurs extraits sur la germination des semences

Cette étude a été réalisée pour vérifier l'absence d'un éventuel effet négatif des extraits de plantes sur le pouvoir germinatif des graines de tomate. Ainsi, parmi les meilleures plantes qui ont inhibé la croissance de *C. m. subsp. michiganensis*, trois ont été utilisées pour traiter les semences de la tomate infectées par ce pathogène. Le traitement des semences et l'évaluation de leur pouvoir germinatif sont réalisés selon la méthode décrite par Tobias *et al.* (2007) légèrement modifiée. Des graines de tomates, récupérées à partir des fruits présentant les symptômes du chancre (issues des plantes inoculées artificiellement au niveau du champ), sont trempées dans l'extrait aqueux de chaque plante à une concentration de 5% pendant une heure. Les graines, ainsi traitées, sont séchées puis semées dans des terrines alvéolées remplies d'un mélange de terre végétale et de tourbe (1 : 2, v/v). Chaque traitement est composé de 17 graines et chaque essai est répété trois fois. Un essai témoin est réalisé dans les mêmes conditions avec des graines trempées dans de l'eau distillée. Les terrines sont placées en blocs aléatoires dans une serre expérimentale et sont arrosées une fois tous les deux jours. Après deux semaines, le pourcentage de graines germées est déterminé pour chaque traitement.

7- Screening phytochimique des PAM

Dans le but de déterminer les composés chimiques susceptibles d'être responsables de l'activité antibactérienne des PAM testées, nous avons jugé intéressant de réaliser un screening phytochimique de ces plantes. Ainsi des chromatographies sur couche mince (CCM) des extraits des PAM sont réalisées pour déterminer les grandes classes de polyphénols. Nous nous sommes intéressés également au dosage des phénols totaux, des flavonoïdes et à la détermination de l'activité antioxydante des PAM ayant montré une inhibition significative de la croissance de *C. m. subsp. michiganensis*.

7.1- Séparation par CCM

Les CCM des extraits aqueux, préparés comme décrit précédemment, sont réalisées sur plaques de gel de silice 60 (Merck). Après dépôt des échantillons, la séparation est effectuée avec le système solvant: acide acétique / eau (15 : 85 ; v/v). Les plaques sont ensuite révélées à l'aide du réactif de Neu (2-aminoéthyl-diphénylborate) à 1 % dans le méthanol et visualisées sous UV. Le réactif de Neu permet d'intensifier la fluorescence naturelle de certains composés phénoliques, cette fluorescence est en effet très diversifiée et variable selon la catégorie de ces phénols (Tableau V.1). L'observation des chromatogrammes se fait à 365 nm. Des témoins sont réalisés avec des composés purs à savoir :

- La rutine représentant des flavonoïdes plus particulièrement des flavonols
- L'acide chlorogénique représentant des acides phénoliques plus précisément de l'ester de l'acide caféique dérivant de l'acide cinnamique.

Tableau V.1 : Les couleurs fluorescentes des principaux composés secondaires des plantes après leur révélation avec le réactif de Neu

Composés phénoliques	Acides hydroxy- cinnamiques (AHC)	Les Esters des AHC	Flavonoïdes
Fluorescence	Bleu vive	Jaune-verdâtre	Jaune, jaune orangé

(Tahrouch, 1992 ; Wagner et Bladt 1996)

7.2- Dosage des phénols totaux

La méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu décrite par Alemanno *et al.* (2003) est adoptée pour ce dosage. A partir d'une solution à 5 % obtenue par macération de la poudre de plante dans du méthanol à 80%, on transfère 25 µl d'extrait végétal dans un tube à essai contenant 110 µl du réactif de Folin. Après homogénéisation et repos pendant 3 min à température ambiante, on ajoute 200 µl d'une solution de carbonate de sodium à 20% (afin d'obtenir un milieu alcalin permettant le déclenchement de la réaction d'oxydoréduction). Ensuite, on ajoute 1,9 ml d'eau distillée. Après homogénéisation et repos pendant 30 min à 60°C à l'obscurité, on procède à la lecture de la densité optique (DO) à 750 nm avec un spectrophotomètre (Janeway 6400).

Il faut noter que des dilutions appropriées avec du méthanol sont préparées avant la lecture de la DO. Le blanc est préparé avec 2 ml du méthanol. La quantification est faite sur la base d'une gamme étalon standard de l'acide caféique. Cette gamme est réalisée par la préparation d'un gradient de concentration de l'acide caféique allant de 0,1 à 0,5 mg/ml dans du méthanol 80%. Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide caféique (EAC) / g poids sec. Toutes les mesures sont faites en trois répétitions et les valeurs sont des moyennes $\pm$ SD.

7.3- Dosage des flavonoïdes

L'estimation de la teneur en flavonoïdes est réalisée selon la méthode décrite par Singh *et al.* (2010) et Harnafi *et al.* (2010) avec quelques modifications. Le réactif à base du chlorure d'aluminium (AlCl_3) est préparé par mixage de 400 mg d'acétate de sodium avec 133 mg du AlCl_3 en poudre dans 100 ml du méthanol 80%. Un volume de 300 μl de ce réactif est ajouté à 600 μl de l'extrait de plante. Après homogénéisation, cette mixture est laissée au repos pendant 30 min à l'obscurité ; à température ambiante. Ensuite, l'absorbance est mesurée à 430 nm. La teneur en flavonoïdes est calculée en mg d'équivalents Rutine (ER) / g poids sec. Une courbe d'étalonnage réalisée avec des solutions de Rutine de concentrations allant de 0,1 à 0,5 mg ml^{-1} dans du méthanol 80% est utilisée pour la détermination de cette teneur. Toutes les mesures sont faites en trois répétitions et les valeurs sont des moyennes $\pm$ SD.

7.4- Evaluation de l'activité antioxydante

Le dosage de l'activité antioxydant est effectué selon le protocole, légèrement modifié, décrit par Rawat *et al.* (2011). Cette méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH (2,2 diphenyl 1 picryl hydrazyl). En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (couleur violette) se réduit en 2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazine (couleur jaune).

La solution du radical DPPH ($\text{DPPH}^\bullet$) (0,1 mM) est préparée dans du méthanol 80%. Un volume de 1,9 ml de la solution $\text{DPPH}^\bullet$ est ajouté à 100 μl de l'extrait de plante. Le mélange est incubé à température ambiante et à l'obscurité pendant 20 min. l'absorbance est ensuite mesurée à 517 nm. L'absorbance initiale de la solution $\text{DPPH}^\bullet$ à la même longueur d'onde est de $0,47 \pm 0,13$. La réduction de l'absorbance est donc mesurée à la même longueur d'onde. Une courbe standard de calibrage est réalisée avec la Trolox (analogue structural hydrosoluble de la vitamine E) dans les mêmes conditions avec des concentrations allant de 0,25 à 1 mM dans du méthanol 80%. Les résultats sont exprimés en unités TEAC (mM

équivalents Trolox par 100 g du poids sec de l'échantillon). Toutes les mesures sont faites en trois répétitions et les valeurs sont des moyennes $\pm$ SD.

8- Analyse statistique

Toutes les données ont été analysées par ANOVA en utilisant le pack Statistica, version 6, Stat-Soft, 2001, France. Les moyennes sont comparées par le test de Newman et Keuls à $P < 0.05$. Les données des dosages des phénols et des flavonoïdes ainsi que ceux de l'activité antioxydante sont des moyennes de trois répétitions $\pm$ SD. Les coefficients de corrélation R et de détermination R^2 sont calculés avec le programme Microsoft Excel 2007.

III. Résultats

1- Prospection et collecte du matériel végétal

Notre collection de plantes est composée de 40 échantillons, récoltés dans différentes zones du sud marocain durant l'année 2006/2007 et 2007/2008. Les plantes récoltées appartiennent à quinze familles, représentées principalement par les Lamiaceae (22,5%), les Asteraceae (15%), les Fabaceae (12,5%), les Rosaceae (7,5%), les Zygophyllaceae (10%) et les Cistaceae (7,5%) (Tableau V.2).

2- Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits des plantes

Les résultats obtenus lors de l'évaluation, *in vitro*, de l'activité antibactérienne des extraits de plantes sur la croissance de *C. m. subsp. michiganensis*, montrent que toutes les plantes testées ont inhibé la croissance de ce pathogène, mais à des degrés différents (Tableau V.2 et Figure V.1). L'analyse statistique des résultats obtenus nous a permis de former trois catégories de plantes significativement différentes selon les valeurs des diamètres des zones d'inhibition (ZI) (Figure V.2).

La catégorie I: regroupe les meilleures plantes : ayant induit un diamètre d'inhibition supérieur à 3 cm. La moyenne des ZI obtenues avec les extraits de plantes appartenant à cette catégorie est de l'ordre de 3,58 cm. Cette catégorie peut être subdivisée en deux sous groupes (Figure V.3). Le premier sous groupe contient une seule plante qui est *Lavandula coronopifolia* (78), avec un diamètre d'inhibition de 4,88 cm. Le deuxième sous groupe comporte les plantes ayant un diamètre d'inhibition compris entre 4,05 cm (*Rubus ulmifolius*) et 2,86 cm (*Cotula cinerea*).

Tableau V.2: Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits de plantes vis-à-vis de *C. m. subsp. michiganensis*.

Code	Nom botanique	Famille	Parties utilisées	Diamètre des ZI* (cm)
73	<i>Acacia raddiana</i>	Fabaceae	Feuilles	1,28 ± 0,04
83	<i>Anvillea radiata</i>	Asteraceae	Tiges et feuilles	3,55 ± 0,07
89	<i>Artemisia inculta</i>	Asteraceae	Tiges et feuilles	2,10 ± 0,13
68	<i>Asteriscus graveolens</i>	Asteraceae	Tiges, feuilles et fleurs	0,83 ± 0,19
62	<i>Ceratonia siliqua</i>	Fabaceae	Feuilles	1,58 ± 0,01
107	<i>Cistus crispus</i>	Cistaceae	Tiges et feuilles	3,20 ± 0,04
114	<i>Cistus monspeliensis</i>	Cistaceae	Tiges et feuilles	3,86 ± 0,05
106	<i>Cleome africana</i>	Capparaceae	Tiges, feuilles et fleurs	1,60 ± 0,14
67	<i>Colocynthis vulgaris</i>	Cucurbitaceae	Feuilles	0,82 ± 0,14
98	<i>Coronilla terminalis</i>	Fabaceae	Tiges, feuilles et fleurs	0,50 ± 0,00
90	<i>Cotula cinerea</i>	Asteraceae	Tiges, feuilles et fleurs	2,86 ± 0,32
76	<i>Fagonia harpago</i>	Zygophyllaceae	Tiges et feuilles	1,88 ± 0,08
93	<i>Fagonia zilloides</i>	Zygophyllaceae	Feuilles	1,27 ± 0,08
2	<i>Halimium antiatlanticum</i>	Cistaceae	Tiges et feuilles	2,06 ± 0,06
81	<i>Hammada scoparia</i>	Chenopodiaceae	Tiges et feuilles	2,26 ± 0,03
65	<i>Ighermia pinifolia</i>	Asteraceae	Tiges, feuilles et fleurs	2,59 ± 0,00
53	<i>Inula viscosa</i>	Asteraceae	Tiges et feuilles	2,15 ± 0,29
78	<i>Lavandula coronopifolia</i>	Lamiaceae	Tiges, feuilles et fleurs	4,88 ± 0,19
101	<i>Lavandula coronopifolia</i>	Lamiaceae	Tiges, feuilles et fleurs	4,00 ± 0,00
94	<i>Lavandula coronopifolia</i>	Lamiaceae	Tiges, feuilles et fleurs	1,62 ± 0,04
3	<i>Lavandula maroccana</i>	Lamiaceae	Tiges et feuilles	3,04 ± 0,00
108	<i>Lavandula stoechas</i>	Lamiaceae	Tiges, feuilles et fleurs	3,33 ± 0,16
25	<i>Lavandula stoechas</i>	Lamiaceae	Tiges, feuilles et fleurs	3,07 ± 0,01
100	<i>Limoniastrum ifniense</i>	Plumbaginaceae	Tiges et feuilles	1,26 ± 0,08
79	<i>Linaria sp.</i>	Scrophulariaceae	Tiges et feuilles	2,63 ± 0,00
91	<i>Ononis natrix</i>	Fabaceae	Tiges et feuilles	1,80 ± 0,03
26	<i>Pistacia atlantica</i>	Anacardiaceae	Feuilles	3,70 ± 0,17
26'	<i>Pistacia atlantica</i>	Anacardiaceae	Feuilles	1,58 ± 0,10
86	<i>Psoralea bituminosa</i>	Fabaceae	Tiges et feuilles	0,90 ± 0,00
99	<i>Reseda alba</i>	Resedaceae	Tiges, feuilles et fleurs	0,50 ± 0,00
43	<i>Rosa canina</i>	Rosaceae	Tiges et feuilles	4,04 ± 0,05
7	<i>Rubus ulmifolius</i>	Rosaceae	Tiges et feuilles	4,05 ± 0,05
92	<i>Ruta tuberculata</i>	Rutaceae	Tiges et feuilles	2,09 ± 0,10
19	<i>Sanguisorba minor</i>	Rosaceae	Tiges et feuilles	0,68 ± 0,14
34	<i>Thymus leptobotrys</i>	Lamiaceae	Tiges, feuilles et fleurs	1,96 ± 0,17
63	<i>Thymus satureioides</i>	Lamiaceae	Tiges, feuilles et fleurs	2,33 ± 0,24
30	<i>Thymus satureioides</i>	Lamiaceae	Tiges, feuilles et fleurs	1,64 ± 0,05
105	<i>Withania adpressa</i>	Solanaceae	Feuilles	2,06 ± 0,08
71	<i>Zygophyllum gaetulum</i>	Zygophyllaceae	Tiges et feuilles	1,73 ± 0,17
104	<i>Zygophyllum gaetulum</i>	Zygophyllaceae	Tiges et feuilles	1,25 ± 0,07

* ZI : Zones d'inhibition de la croissance de *Cmm*. Les valeurs sont des moyennes de 15 répétitions ± σ . Certains échantillons correspondant à la même espèce ont été récoltés simultanément: (78 et 101) au niveau de la même localité ; 94 provient d'une localité différente ; à des périodes différentes (26 et 26' ; 30 et 63) ; ou encore cueillies à des périodes et dans des localités différentes (25 et 108). (Talibi *et al.* 2011).

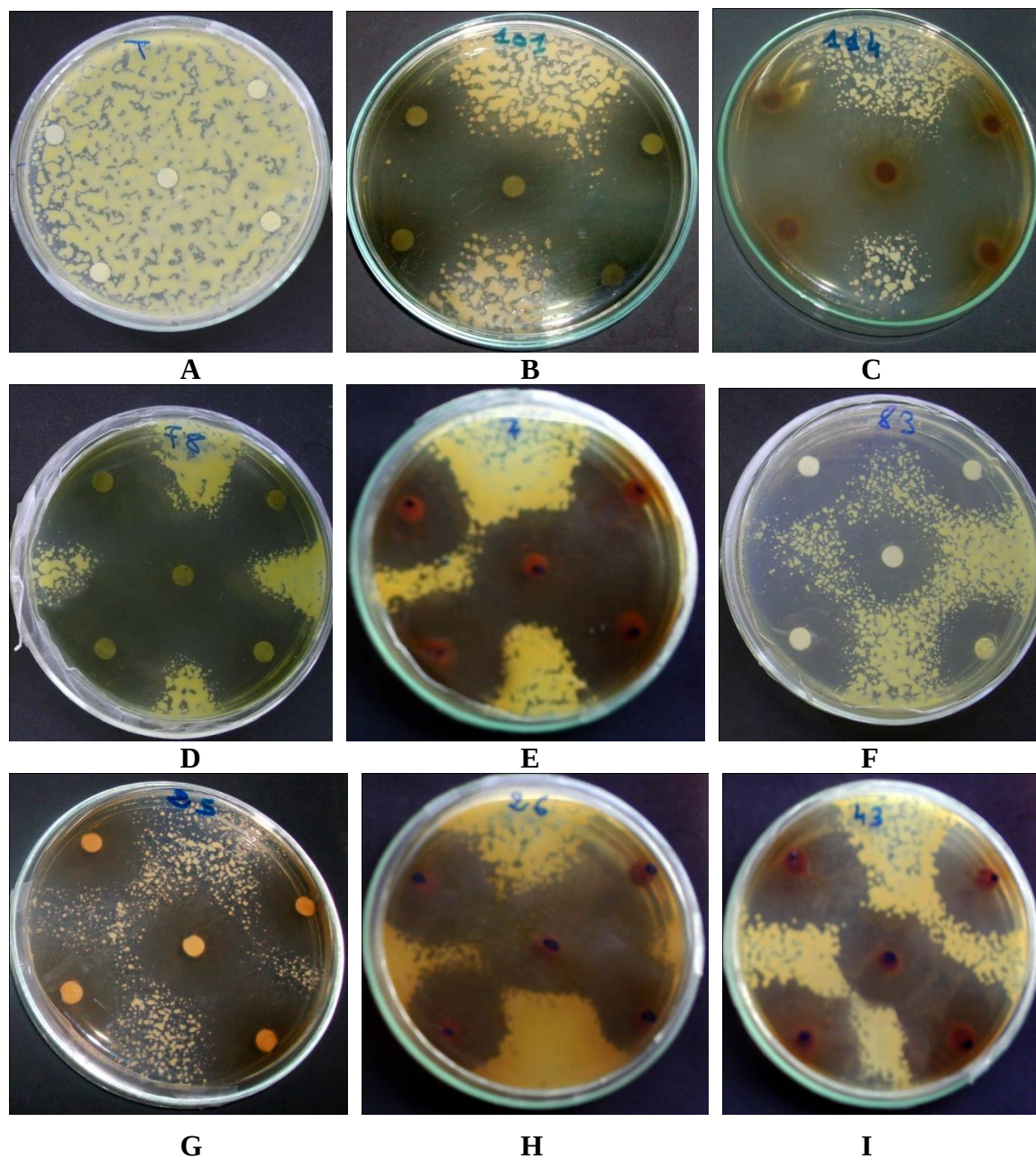


Figure V.1: Inhibition de la croissance de *C. m. subsp. michiganensis* (Cmm H195) par les extraits aqueux de certaines plantes aromatiques et médicinales. A: Témoin. B: *Lavandula coronopifolia* (101). C: *Cistus monspeliensis* (114). D: *Lavandula coronopifolia* (78). E: *Rubus ulmifolius* (07). F: *Anvillea radiata* (83). G: *Lavandula stoechas* (25). H: *Pistacia atlantica* (26). I: *Rosa canina* (43). (Talibi et al. 2011).

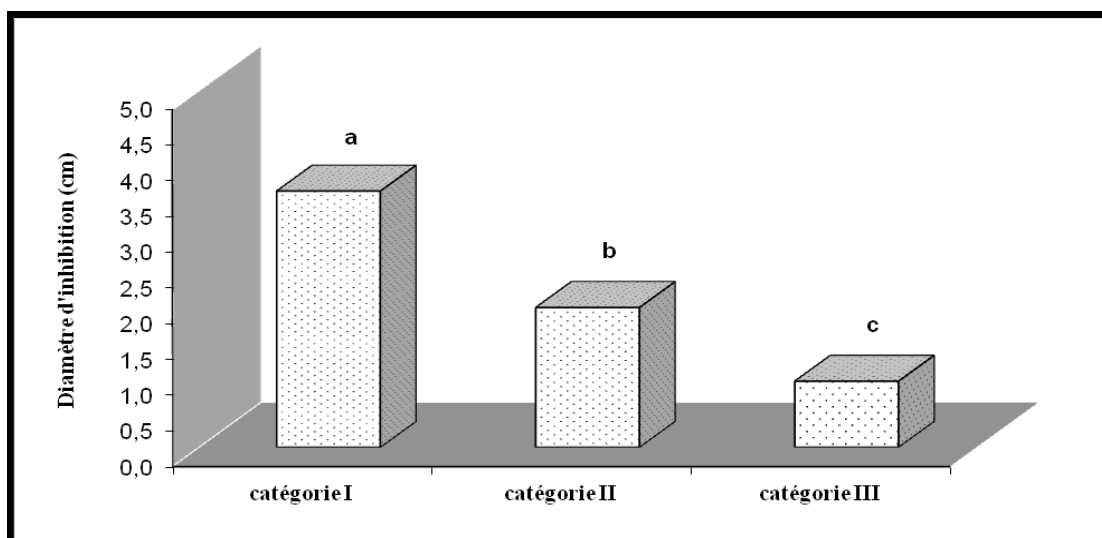


Figure V.2 : Les trois catégories de plantes dont les extraits inhibent la croissance de *C. m. subsp. michiganensis*. Les résultats sont analysés avec une ANOVA suivie par le test de Newman & Keuls à $P < 0,05$. Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.

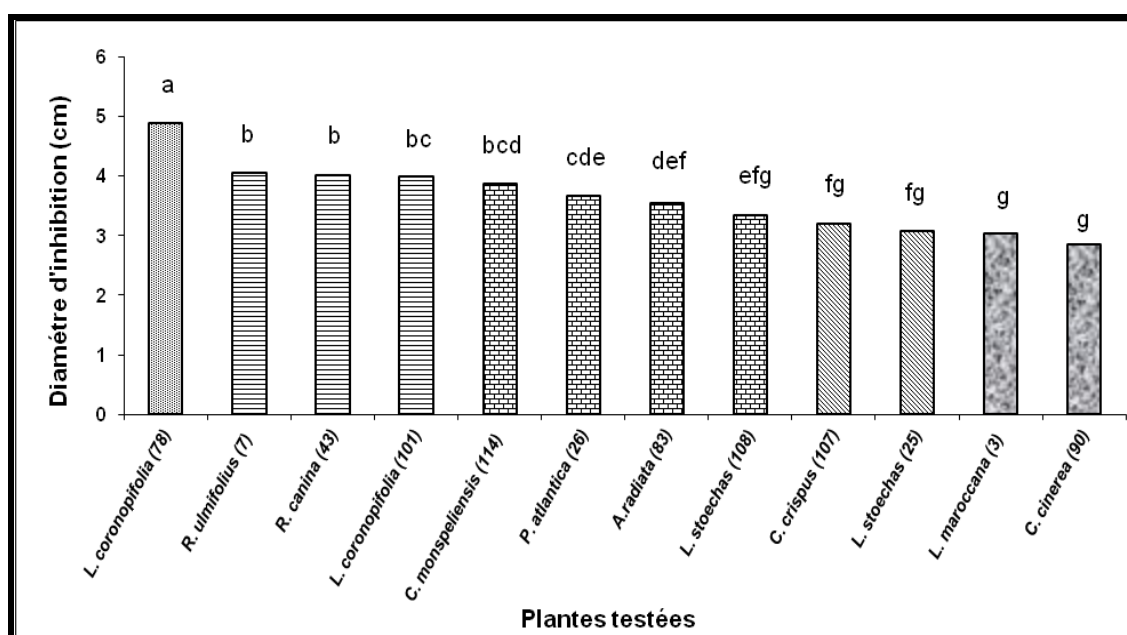


Figure V.3 : Inhibition de la croissance de *C. m. subsp. michiganensis* par les plantes (catégorie I). Les résultats sont analysés avec une ANOVA suivie par le test de Newman & Keuls à $P < 0,05$. Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.

La catégorie II : regroupe les plantes qui ont moyennement inhibé la croissance bactérienne de *C. m. subsp. michiganensis*. La valeur moyenne des ZI est de 1,95 cm. Cette catégorie peut être également subdivisée en deux sous groupes (Figure V.4): le premier contient le genre *Linaria* sp et *Ighermia pinifolia* avec des diamètres d'inhibition supérieurs à 2,5 cm alors que le deuxième englobe les autres plantes dont le ZI est compris entre 2,33 cm pour *Thymus satureioides* (63) et 1,58 cm pour *Ceratonia siliqua*.

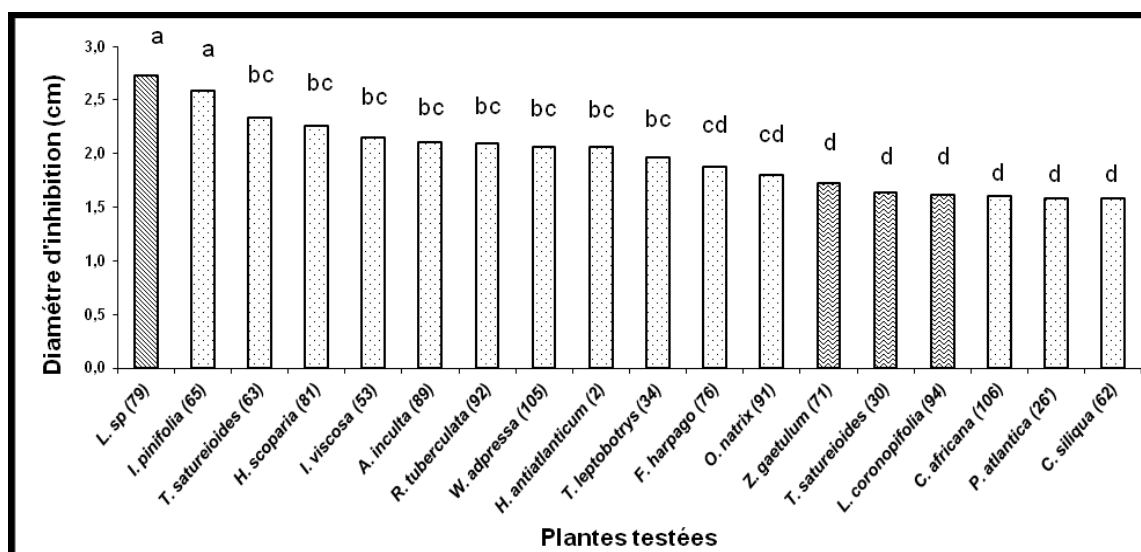


Figure V.4 : Inhibition de la croissance de *C. m. subsp. michiganensis* par les extraits de plantes (catégorie II). Les résultats sont analysés avec une ANOVA suivie par le test de Newman & Keuls à $P < 0,05$. Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.

La catégorie III : comporte les plantes qui ont un faible effet inhibiteur sur la croissance de *C. m. subsp. michiganensis*. La valeur moyenne des ZI ne dépasse pas 1 cm. Deux sous groupes peuvent être également distingués ; le premier regroupe les plantes dont les extraits inhibent la croissance de *C. m. subsp. michiganensis* avec une zone d'inhibition comprise entre 1,25 cm (*Zygophyllum gaetulum* 104) et 1,31 cm (*Acacia raddiana*). Le deuxième renferme les plantes dont les zones d'inhibition sont comprises entre 0,5 cm (*Coronilla terminalis*) et 0,9 cm (*Psoralea bituminosa*) (Figure V.5).

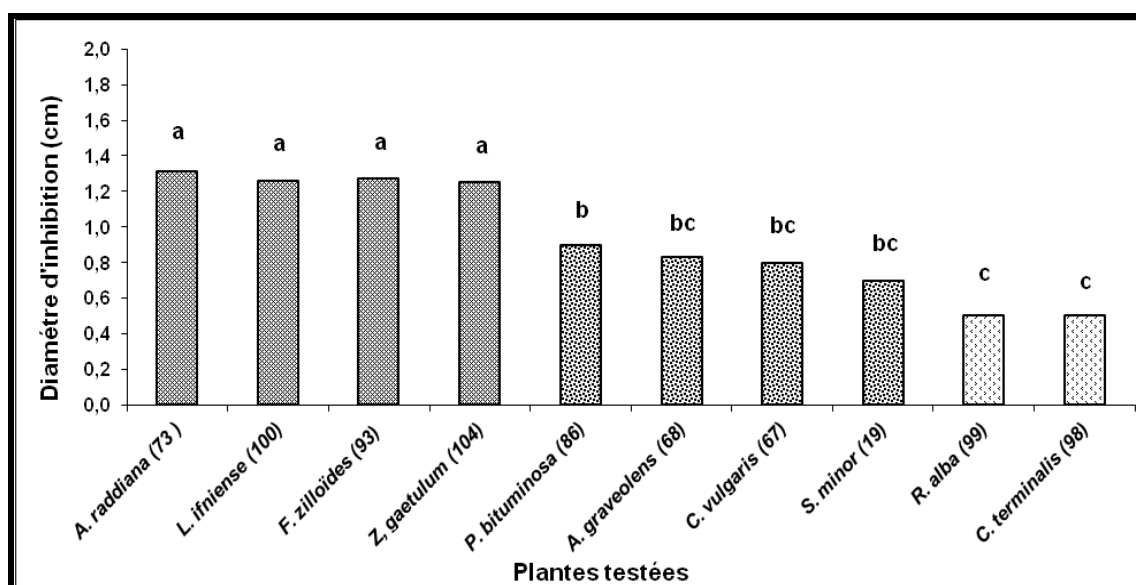


Figure V.5: Inhibition de la croissance de *C. m. subsp. michiganensis* par des extraits de plantes (catégorie III). Les résultats sont analysés avec une ANOVA suivie par le test de Newman & Keuls à $P < 0,05$. Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.

3- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB)

Les résultats obtenus pour les extraits aqueux des meilleures PAM sont présentés dans le tableau V.3. D'après ces résultats, on constate que *Rubus ulmifolius*, *Pistacia atlantica* et *Anvillea radiata* possèdent la même valeur de CMI qui est également la plus faible ($3,125 \text{ mg ml}^{-1}$). Cependant, les extraits des plantes précitées présentent des CMB différentes. Ainsi, *Rubus ulmifolius* présente une activité bactéricide deux fois plus importante que celle de *Pistacia atlantica* et quatre fois plus importante que celle d'*Anvillea radiata*.

Quant aux autres plantes testées, leurs CMI (égales) sont deux fois plus élevées par rapport à celles des extraits de plantes précitées ; soit $6,25 \text{ mg ml}^{-1}$. Toutefois, *Lavandula coronopifolia* (78) et *Lavandula stoechas* (108) se distinguent par des activités bactéricides qui sont deux fois supérieures par rapport à celles de *Rosa canina*, *Cistus monspeliensis* et *Cistus crispus*.

Le rapport CMB/CMI permet de conclure que sept extraits sur les huit testés ont un effet bactéricides puisque la valeur de ce rapport est inférieur ou égale à quatre. L'extrait d'*Anvillea radiata* est bactériostatique car le rapport est égal à huit. *C. m. subsp. michiganensis* n'est tolérant à aucun des extraits testés.

Tableau V.3: Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) exprimées en mg ml⁻¹ des extraits aqueux qui ont donné les meilleurs pourcentages d'inhibition de l'agent pathogène

Plantes testées	ZI ^d (cm)	CMI	CMB	CMB / CMI *
<i>Rubus ulmifolius</i> (7)	4,05	3,125	6,25	2
<i>Pistacia atlantica</i> (26)	3,70	3,125	12,50	4
<i>Anvillea radiata</i> (83)	3,55	3,125	25,00	8
<i>Lavandula coronopifolia</i> (78)	4,88	6,25	12,50	2
<i>Lavandula stoechas</i> (108)	3,33	6,25	12,50	2
<i>Rosa canina</i> (43)	4,04	6,25	25,00	4
<i>Cistus monspeliensis</i> (114)	3,86	6,25	25,00	4
<i>Cistus crispus</i> (107)	3,20	6,25	25,00	4

* Si $CMB / CMI \leq 4$ l'extrait inhibiteur est bactéricide, si $CMB / CMI > 4$ il est bactériostatique et si $CMB / CMI \geq 32$ La bactérie est dite tolérante (Marmonier 1990 cité par Moroh *et al.* 2008 et Ouattara *et al.* 2013).

4- Effet du traitement des semences par les PAM sur la population de l'agent pathogène

Le traitement des semences, artificiellement inoculées par le pathogène, avec les extraits aqueux des meilleures plantes a permis de réduire significativement la population du pathogène par rapport au témoin non traité. La plus importante réduction (72,32%) est obtenue avec l'extrait aqueux de *L. coronopifolia* (78). Les extraits aqueux de *R. ulmifolius* (7), *C. monspeliensis* (114) et de *R. canina* (43) ont aussi réduit significativement la population du pathogène avec des pourcentages de réduction de 50,89%, 33,92 et 28,92%, respectivement. En effet, la population du pathogène à la surface des semences passe de 5,6 Log UFC/graine dans le cas du témoin à seulement 1,55 ; 2,75 ; 3,7 et 3,98 Log UFC/graine pour les extraits aqueux de *L. coronopifolia* (78), *R. ulmifolius* (7), *C. monspeliensis* (114) et de *R. canina* (43) respectivement (Figure V.6).

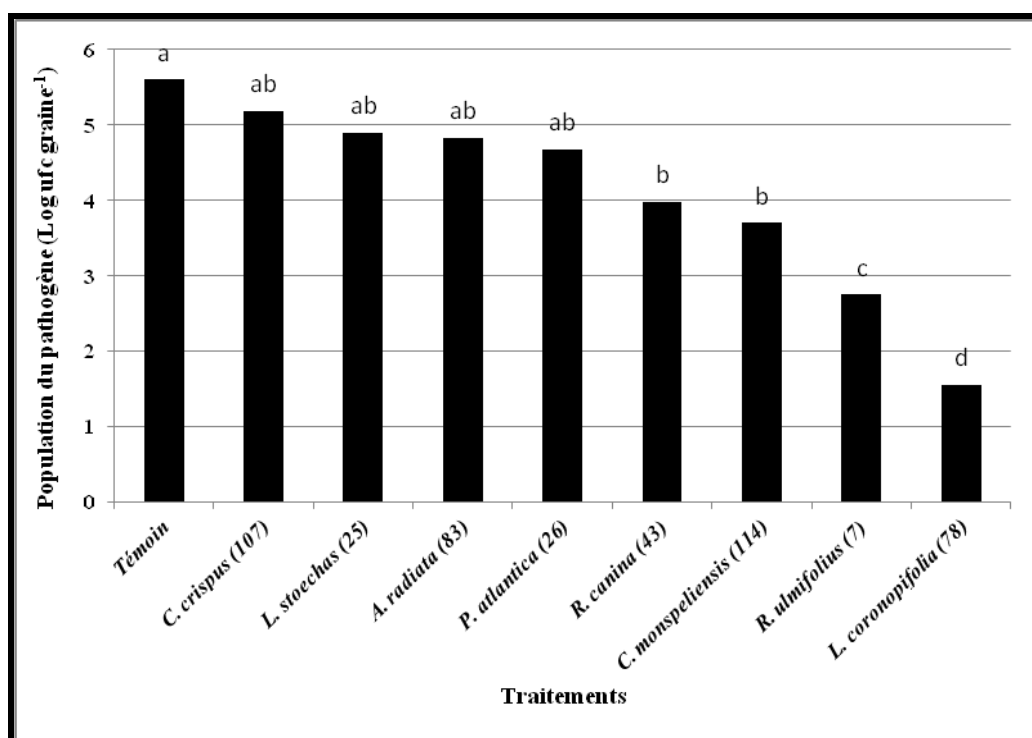


Figure V.6 : Effet des extraits aqueux des meilleures plantes sur la population de l'agent pathogène à la surface de semences de tomate inoculées artificiellement. Les résultats sont analysés avec une ANOVA suivie par le test de Newman & Keuls à $P < 0,05$. Des lettres différentes indiquent des résultats significativement différents.

5- Evaluation du pouvoir germinatif des semences traitées par les extraits des plantes

Nous avons observé que la germination des graines de tomate (plus de 98%) a eu lieu deux semaines après leur semis, mais avec des taux de germination variables d'un traitement à l'autre (Figure V.7). En effet, les résultats obtenus ont montré que les pourcentages de germination des graines traitées avec les extraits des plantes sélectionnées sont significativement supérieurs à celui du témoin non traité. Cette hausse du pourcentage de germination des graines traitées est la plus élevée (98%) lors de l'utilisation de l'extrait aqueux de *Lavandula coronopifolia* (78). Des taux de germination significatifs de l'ordre de 88% et 84% ont été également observés respectivement en présence des extraits aqueux de *Cistus monspeliensis* et de *Rubus ulmifolius*. Nous constatons aussi qu'en plus de l'effet inhibiteur vis-à-vis du pathogène, les extraits des plantes testées activent la germination des graines de tomates.

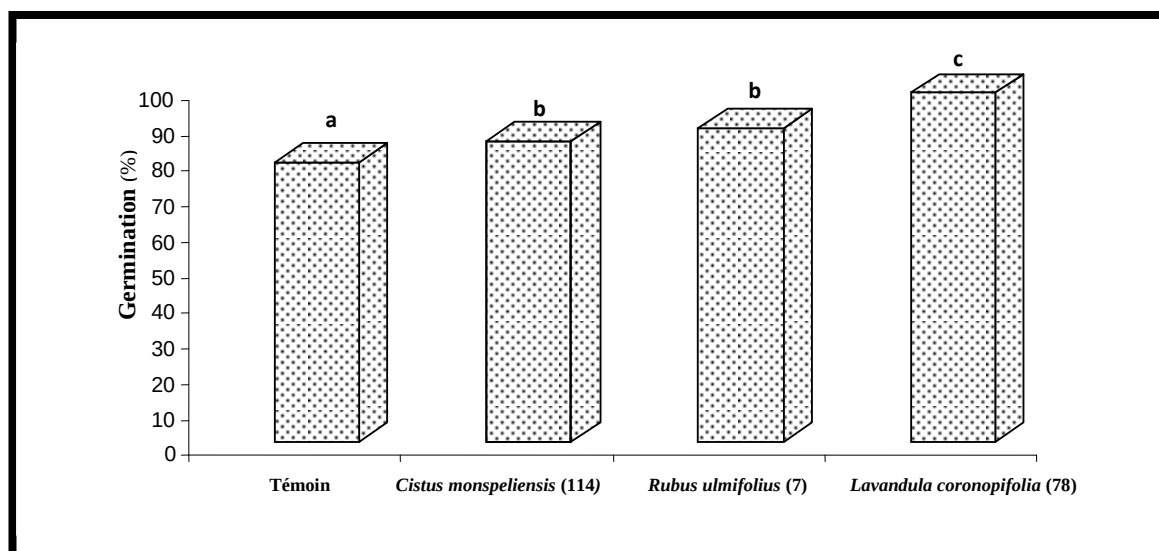


Figure V.7: Effet des extraits aqueux de certaines PAM sur la germination des semences de tomate. Les résultats sont analysés avec une ANOVA suivie par le test de Newman & Keuls à $P < 0,05$. Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes (Talibi *et al.* 2011).

6- Screening phytochimique des PAM

6.1- Chromatographie sur couche mince (CMM)

Bien que la technique de CCM ne permette, ni quantitativement ni qualitativement, de déterminer les différents composés phénoliques des PAM, elle donne néanmoins une idée sur la présence des grandes classes de polyphénols qui sont responsables de l'activité biologique des PAM. Le screening phytochimique de l'ensemble des échantillons a montré une grande diversité de composés phénoliques qui diffèrent aussi bien par leurs rapports frontaux (RF) que par leurs fluorescences sous UV. La figure V.8 montre les profils obtenus avec les meilleurs PAM ainsi que ceux des deux témoins (L'acide chlorogénique et la rutine). Une meilleure séparation des différents composés pourrait être obtenue d'une part, par changement du système solvant et d'autre part par dilution des quantités déposées pour avoir des bandes bien individualisées, chose qui permettrait une meilleure analyse comparative de nos échantillons en présence d'une série de témoins plus représentative.

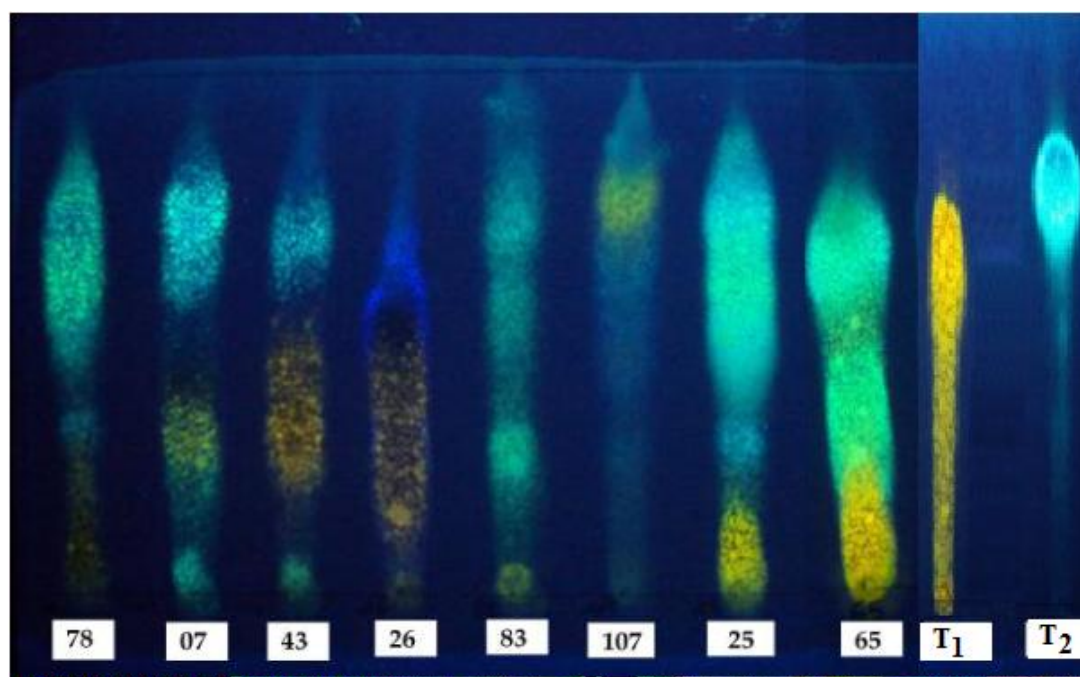


Figure V.8 : Profils chromatographiques des PAM étudiées: *Lavandula coronopifolia* (78); *Rubus ulmifolius* (7); *Rosa canina* (43); *Pistacia atlantica* (26); *Anvillea radiata* (83); *Cistus crispus* (107); *Lavandula stoechas* (25); *Ighermia pinifolia* (65); (T1: Rutine ; T2: acide chlorogénique).

6.2- Dosage des phénols totaux, des flavonoïdes et de l'activité antioxydante

Si on analyse les résultats de manière globale, on note que les espèces *Lavandula coronopifolia* (78); *Rubus ulmifolius* (7); *Rosa canina* (43); *Pistacia atlantica* (26); *Anvillea radiata* (83); *Cistus crispus* (107); *Lavandula stoechas* (25) et *Ighermia pinifolia* (65) présentent des teneurs en phénols, en flavonoïdes et des activités anti oxydantes largement supérieures aux autres plantes testées. Par ailleurs, il est important de souligner que ces différents paramètres évoluent, le plus souvent, de façon proportionnelle aux diamètres des zones d'inhibition. De manière plus précise, la teneur en phénols totaux des espèces testées varie de $3,98 \pm 0,16$ à $62,78 \pm 1,51$ mg d'équivalent acide caféique (EAC) par g de poids sec (PS), celle en flavonoïdes varie de $17,4 \pm 3,4$ à $19,82 \pm 6,5$ mg d'équivalent rutine (ER) par g de PS et l'activité anti oxydante varie de 1,18 à 550,67 mM d'équivalent Trolox par 100g de PS (Tableau V.4). De plus, une corrélation positive significative a été observée d'une part, entre la teneur en phénols ($R = 0,87$ et $R^2 = 0,76$), la teneur en flavonoïdes ($R = 0,96$ et $R^2 = 0,93$), et l'activité antimicrobienne des extraits aqueux et d'autre part entre la teneur en phénols, la teneur en flavonoïdes et l'activité anti oxydante des extraits aqueux (Tableau V.5). Ces résultats confirment la richesse des PAM sélectionnées en phénols et en flavonoïdes, qui sont vraisemblablement impliqués dans leurs activités antibactériennes et leurs capacités

antioxydantes. La corrélation positive entre l'activité biologique antibactérienne et l'activité antioxydante permet de dire que plus un extrait est doté d'une capacité antioxydante plus il est intéressant en terme de lutte biologique. Par ailleurs, la capacité antioxydante des extraits pourrait expliquer l'activation de la germination déjà observée et qui serait due à l'action des molécules antioxydantes sur le pH du milieu environnant des semences. En effet les variations du pH agissent sur le pouvoir germinatif des semences de plusieurs espèces végétales (Chachalis et Reddy 2000).

Tableau V.4: Teneur en phénols totaux, en flavonoïdes et activité antioxydante des plantes aromatiques et médicinales sélectionnées pour leur activité antibactérienne vis-à-vis de l'agent du chancre bactérien de la tomate ^a

Plantes testées	[Phénols] (mg EAC ^b /g PS)	[Flavonoïdes] (mg ER ^c /g PS)	ZI ^d (cm)	TEAC ^e (mM/100g PS)
<i>Lavandula coronopifolia</i> (78)	55,58 ± 5,07	19,51 ± 0,49	4,88	550,67
<i>Rubus ulmifolius</i> (7)	37,52 ± 6,64	19,82 ± 0,65	4,05	430,50
<i>Rosa canina</i> (43)	44,68 ± 0,573	17,58 ± 0,98	4,04	333,73
<i>Cistus monspeliensis</i> (114)	37,21 ± 0,63	19,79 ± 2,07	3,86	233,27
<i>Pistacia atlantica</i> (26)	62,78 ± 1,51	18,38 ± 1,53	3,70	460,49
<i>Anvillea radiata</i> (83)	24,13 ± 5,02	15,39 ± 1,43	3,55	166,89
<i>Cistus crispus</i> (107)	27,62 ± 0,29	16,53 ± 0,31	3,20	118,63
<i>Lavandula stoechas</i> (25)	32,58 ± 4,10	6,30 ± 0,26	3,07	90,80
<i>Ighermia pinifolia</i> (65)	45,41 ± 5,70	14,72 ± 0,60	2,59	73,49
<i>Artemisia inculta</i> (89)	21,99 ± 1,18	10,31 ± 1,15	2,11	35,22
<i>Ceratonia siliqua</i> (62)	21,20 ± 0,99	7,44 ± 2,26	1,58	55,38
<i>Fagonia zilloides</i> (93)	6,55 ± 0,78	5,56 ± 1,6	1,27	11,08
<i>Zygophyllum gaetulum</i> (104)	3,98 ± 0,16	2,26 ± 1,8	1,25	1,18
<i>Colocynthis vulgaris</i> L. (67)	6,55 ± 0,35	2,13 ± 0,72	0,82	9,82
<i>Sanguisorba minor</i> (19)	4,47 ± 0,28	1,74 ± 0,34	0,68	3,64
<i>Reseda alba</i> (99)	5,01 ± 0,13	1,99 ± 0,28	0,50	3,59

^a Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions ± SD. ^b Les résultats sont exprimés en mg équivalents acide caféique (EAC) par g du poids sec (PS) de plante. ^c Les résultats sont exprimés en mg équivalents Rutine (ER) par g du poids sec (PS) de plante. ^d Diamètres des Zones d'inhibitions des extraits aqueux exprimées en cm. ^e TEAC : Trolox equivalent antioxidant capacity : capacité antioxydant équivalent Trolox. Résultats exprimés en mM équivalents Trolox par 100 g du poids sec.

Tableau V.5: Les indices de Corrélation (R) et de détermination (R²) entre la teneur en phénols (Ph), la teneur en flavonoïdes (Flav), la capacité antioxydante (TEAC) et l'activité antibactérienne des extraits aqueux (diamètres des zones d'inhibition) (ZI).

	Ph/Flav	Ph/ZI	Flav/ZI	Ph/TEAC	Flav/TEAC	TEAC/ZI
R	0,88852516	0,87339293	0,96832161	0,84607994	0,78914914	0,86716811
R²	0,78947696	0,7628152	0,93764673	0,71585126	0,62275636	0,75198053

IV- Discussion

Les travaux de recherche entrepris dans ce chapitre avaient pour objectif d'évaluer le potentiel antibactérien de 40 plantes aromatiques et médicinales (PAM) contre *C. m. subsp. michiganensis*. En fait, les extraits aqueux de ces PAM ont été étudiés d'une part afin de mesurer leur capacité de réduction, voir même d'élimination de l'inoculum de cet agent pathogène sur les semences de tomate et d'autre part pour évaluer la richesse relative de ces PAM en composés phénoliques mais également de doser leur activité anti oxydante. Cette démarche entreprise pourrait constituer une alternative prometteuse de lutte anti bactérienne aux produits chimiques dont les inconvénients formels et multiples constituent une contrainte de taille aussi bien pour le consommateur que pour l'environnement. Ceci est d'autant plus important qu'on ne dispose toujours pas jusqu'à l'heure actuelle de cultivars commerciaux résistants à cette bactérie.

Les résultats du screening préliminaire ont montré que les extraits aqueux de toutes les PAM testées présentent une activité antibactérienne. Les espèces les plus efficaces appartiennent aux familles des Lamiaceae, Rosaceae, Asteraceae, Anacardiaceae et Cistaceae. Les résultats obtenus avec les espèces appartenant au genre *Lavandula* sont remarquables et concordent parfaitement avec ceux de Daferera *et al.* (2003) qui ont rapporté que le genre *Lavandula* comporte plusieurs espèces ayant une activité antimicrobienne envers certains pathogènes des plantes. En outre, ces mêmes auteurs ont montré que l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia*, à 600 mg ml⁻¹, a complètement inhibé la croissance de *C. m. subsp. michiganensis*. D'après ces auteurs, l'activité antibactérienne de cette huile essentielle est probablement due à des composés bioactifs, en particulier le linalool et l'acétate de linalyl (Daferera *et al.* 2003). En outre, Teixeira *et al.* (2012) ont également confirmé le potentiel élevé de lutte antibactérienne exercé par un des représentants de ce genre. Ils ont en effet démontré que les extraits méthanoïques de *Lavandula stoechas* présentent des propriétés antibactériennes importantes vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*. Ce pouvoir est lié aux composés phénoliques et terpéniques de cette plante. D'après nos résultats, la deuxième espèce qui a significativement inhibé la croissance de *C. m. subsp. michiganensis in vitro* est *R. ulmifolius*. En fait, Sisti *et al.* (2008) avaient montré que l'extrait sec de *R. ulmifolius* présente un grand intérêt dans la mesure où il possède une activité biologique contre un grand nombre de pathogènes humains. Dans une autre étude, Thiem et Goślińska (2004) avaient rapporté, que les extraits des feuilles de *Rubus chamaemorus* étaient doués d'une activité antibactérienne envers certaines bactéries Gram

négatif. Par ailleurs, Arima *et al.* (2002) ont montré que la rutine (quercétine-3-rutinoside), est responsable de l'activité antimicrobienne contre certaines bactéries Gram négatif et Gram positif. A travers nos résultats, le pouvoir inhibiteur de la croissance de *C. m. subsp. michiganensis* exercé par *Rosa canina* s'est révélé significatif. Ce résultat s'accorde bien avec celui de Montazeri *et al.* (2011) qui ont montré que les extraits méthanoliques et aqueux de *Rosa canina* présentent une activité antibactérienne contre plusieurs pathogènes (*S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *B. subtilis* et *C. albicans*). Par ailleurs, ce résultat concorde également avec ceux de Basim et Basim (2004), qui ont montré que l'huile essentielle de *Rosa damascena* est efficace contre *Erwinia amylovora*, l'agent du feu bactérien des rosacées. Dans des études antérieures, les composants phénoliques spécifiques du genre *Rosa* tels que les catéchines et les procyanidines se sont révélés être des antioxydants efficaces. En ce qui concerne l'effet inhibiteur vis-à-vis de *C. m. subsp. michiganensis* exercé par *Anvillea radiata*, les résultats obtenus corrélaient bien avec ceux d'autres auteurs. En effet, El Hassany *et al.* 2004 ont démontré l'existence d'un nouveau composé terpénique, obtenu par extraction au chloroforme, qui est le principal constituant impliqué dans l'activité antibactérienne. Ce composé exerce une forte inhibition vis-à-vis de *Bacillus cereus*, *Streptococcus C*, *Proteus vulgaris*; *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Nous avons obtenu également une importante activité anti *C. m. subsp. michiganensis* avec les extraits de *P. atlantica*. Ceci est en parfait accord avec les résultats de Hosseini *et al.* (2013) qui ont mis en évidence le potentiel inhibiteur élevé de *Streptococcus mutans* par les extraits aqueux et d'éther diéthylique de cette plante. En ce qui concerne le genre *Cistus*, nous avons montré que *C. monspeliensis* et *C. crispus* ont induit une inhibition significative de la multiplication de *C. m. subsp. michiganensis*. Ces résultats sont en accord avec la plupart des travaux impliquant les représentants de ce genre. En effet, Bouamama *et al.* (2006) ont rapporté que les feuilles de *C. villosus* et *C. monspeliensis* ont une activité antibactérienne envers quelques bactéries Gram négatif responsables de certaines pathologies humaines. Cette activité est liée à la richesse de cette espèce en poly-phénols qui sont connus pour leur propriété antibactérienne. En outre, il a été démontré de manière répétée que les extraits aqueux et méthanoliques de *C. villosus* induisent une activité antimicrobienne très élevée contre les principaux pathogènes des agrumes en post-récolte (Ameziane *et al.* 2007). Talibi *et al.* 2012 rapportent aussi que les extraits aqueux de *C. monspeliensis*, *C. villosus* et *C. crispus* originaires du Sud Marocain, réduisent la croissance mycélienne de *Geotrichum candidum*

l'agent causal de la pourriture amère sur fruits d'agrumes en post récolte. Cette réduction significative est de l'ordre de 100 %, 98% et 52% respectivement.

Lors de l'analyse de l'ensemble des PAM testées, il a été révélé que le pouvoir inhibiteur contre *C. m. subsp. michiganensis* d'une espèce végétale varie à la fois en fonction de la localité et de la saison de récolte. En effet, dans le cas de *Lavandula coronopifolia*, les échantillons 78 et 101 (provenant de la même localité et échantillonnés pendant la même période) présentent respectivement des diamètres d'inhibition de l'agent pathogène 3 et 2,5 fois plus importants par rapport à celui de l'échantillon 94 (récolté pendant la même période que les deux autres mais au niveau d'une localité différente). Ces résultats concordent parfaitement avec ceux de Karousou *et al.* (2005) qui ont révélé une variabilité du pouvoir antimicrobien de la même espèce végétale selon la zone de récolte, ceci de manière corrélée à la modification du taux de métabolites secondaires. Ce même constat peut être formulé dans le cas de deux échantillons de la même espèce lorsqu'ils sont récoltés à des saisons différentes ; comme c'est le cas des échantillons de *Pistacia atlantica*, et de *Thymus satureioides*. Ainsi, *P. atlantica* (26) a induit un diamètre d'inhibition 2,34 fois plus important que *P. atlantica* (26') ; il en est de même pour *Thymus satureioides*. Cette variation est certainement due à une modification des taux, en fonction de la période de récolte, des composés phénoliques responsables de l'effet inhibiteur. En effet, Il a été démontré par plusieurs auteurs (Miliauskas *et al.* 2004 ; Ebrahimi *et al.* 2008 ; Atanasova et Ribarova 2009, Tomas-Menor *et al.* 2013) que la composition phytochimique des plantes dépend de plusieurs variables telles que la localité, le type de sol, l'âge de la plante, la saison de récolte, la partie récoltée, le chémotype et les conditions climatiques. Ceci est d'autant plus intéressant qu'une forte corrélation a été signalée entre la variation de l'amplitude de l'activité antibactérienne et la composition phytochimique des échantillons appartenant à la même espèce végétale (Hsouna et Hamdi 2012).

Le screening phytochimique réalisé lors de cette étude a prouvé la richesse des plantes étudiées en phénols et en flavonoïdes. La teneur en phénols totaux varie entre 3,98 et 62,78 mg d'EAC (Equivalents Acide Caféique) par g du poids sec (PS). Cette augmentation de la concentration en phénols totaux au niveau de certains échantillons a été également soulignée par Surveswaran *et al.* (2007). Ces auteurs ont rapporté des teneurs allant de 0,6 à 356,3 mg d'équivalents acide gallique (EAG) par g du poids sec au niveau des extraits de 113 plantes médicinales indiennes. Dans le même contexte, Bahri-sahloul *et al.* (2009) ont montré, lors de l'analyse de 8 échantillons de PAM, que la quantité de ces métabolites secondaires varie entre

0,45 et 16,38 mg d'EAG par g du PS. Cette richesse relative de certaines PAM en polyphénols a été également confirmée par Ebrahimzadeh *et al.* (2010) dont l'analyse des échantillons a révélé une teneur en phénols totaux variant entre 35,4 et 90 mg d'EAG par g de poids sec. Enfin, il est essentiel de préciser qu'une fluctuation significative, de 52,8 à 16,65 mg d'EAG par g de PS a été relevée également lors de l'analyse des feuilles de la même espèce, *Cinnamomum osmophleum*, récoltées à partir de onze localités différentes (Wu *et al.* 2013).

En ce qui concerne le dosage des flavonoïdes, les résultats obtenus ont révélé que la teneur des plantes testées en ces composés oscille entre 1,74 et 19,82 mg d'ER par g du PS. La grande variabilité des taux de flavonoïdes au niveau des PAM analysées a été rapportée par El Allagui *et al.* (2007). D'après cette équipe, les teneurs en ces composés au niveau des cinq échantillons étudiés varient entre 2,90 et 36,20 mg d'équivalent quercétine par g de poids sec. Ebrahimzadeh *et al.* (2010) ont montré aussi que les plantes qu'ils ont étudiées ont des teneurs relativement importantes en flavonoïdes, allant de 22,80 à 48,20 mg d'équivalent quercétine par g de PS. Selon Bahri-Sahloul *et al.* (2009), les taux de flavonoïdes des échantillons testés varient entre 3,178 et 7,536 mg d'ER par g du PS. Ces résultats sont d'un grand intérêt du fait qu'ils traduisent une fluctuation significative des concentrations de ces métabolites selon la localité, la variété et même selon le stade de maturité de la plante ; ceci pour le même organe étudié (fleurs). Par ailleurs, une variabilité remarquable des teneurs en ces composés a été relevée lors de l'étude comparative des mêmes échantillons de PAM ; soumis à divers types de protocoles d'extraction ou de fractionnement (Li *et al.* 2010 ; Montazeri *et al.* 2011).

L'activité antioxydante des 16 PAM étudiées, exprimée en mM TEAC par 100g PS, varie entre 1,18 et 550,67 mM TEAC par 100g de PS. Ce résultat est parfaitement comparable à ceux décrits par d'autres auteurs (Fu *et al.* 2010...etc). En effet, Surveswaran *et al.* (2007) ont montré après un large échantillonnage et analyse de 133 espèces de plantes aromatiques et médicinales indiennes que cette activité antioxydante varie entre 0,16 et 500,70 mM TEAC par 100 g de PS. La variabilité considérable de l'activité antioxydante entre les divers échantillons est certainement liée à la présence d'une combinaison différente de composés chimiques ayant ce potentiel anti oxydant ; ceci n'est pas uniquement déterminé par la nature et la concentration de chaque composé mais lié également à la synergie d'action que peuvent établir certains constituants par rapport à d'autres. Un essai d'analyse comparative, cas par cas, de nos meilleurs échantillons par rapport à des représentants du même genre décrits dans

la littérature a été menée. Cependant, on s'est heurté à une certaine hétérogénéité des résultats qui s'explique parfaitement par la diversité des facteurs extrinsèques (région géographique, climat) et intrinsèques (variété, stade de maturation, organe analysé, procédé d'extraction et technique de dosage) auxquels sont soumis les échantillons végétaux et induisant des profils phytochimiques hétérogènes. En dépit de cela, on doit retenir qu'au moins six de nos échantillons sont remarquables en raison de leurs teneurs élevées en phénols, en flavonoïdes mais aussi par leur potentiel anti oxydant significatif. Ceci est d'autant plus intéressant qu'on n'a testé que les extraits aqueux. En effet, les extraits méthanoliques, éthyliques ou préparés à l'aide d'autres solvants organiques révélerait des potentiels encore plus importants comme cela a déjà été démontré de manière répétée par plusieurs auteurs (Panizzi *et al* 2002 ; Fu *et al* 2012 ; de Oliveira *et al.* 2012). L'intérêt majeur que représente nos échantillons se traduit également par la forte corrélation d'une part entre la teneur en phénols ($R = 0.84$) et en flavonoïdes ($R = 0.789$) et l'activité antioxydante et d'autre part entre la teneur en phénols ($R = 0.87$) mais surtout en flavonoïdes ($R = 0.96$) et l'activité anti bactérienne. Ces différentes corrélations s'accordent bien avec les résultats d'autres équipes pour d'autres modèles plante / agent pathogène (Cai *et al* 2004 ; Bahri-Sahloul *et al* 2009 ; Fu *et al.* 2010 et Surveswaran *et al.* 2010). Par ailleurs, les phénols semblent être davantage impliqués dans l'activité anti oxydante ; alors que l'activité anti microbienne apparaît beaucoup plus liée aux flavonoïdes (Bahri-Sahloul *et al* 2009 ; Fu *et al.* 2010 ; Surveswaran *et al.* 2010).

Le criblage phytochimique a été effectué pour les extraits des PAM à activité antibactérienne contre *C. m. subsp. michiganensis* au moyen de la CCM. Les CCM obtenues et visualisées sous UV à 365 nm ont présenté des couleurs orange, jaune, bleu, vert, pouvant correspondre à plusieurs classes de métabolites secondaires. En effet :

- Les coumarines apparaissent avec des couleurs jaune vert (Georgievskii, 1990, cité par Wagner et Bladt, 1996),
- Les xanthones donnent une couleur orange (Ladiguina *et al.* 1983 cité par Wagner et Bladt, 1996),
- Les flavonols et/ou auronnes développent une couleur jaune quelconque (Dawson *et al.* 1991 cité par Wagner et Bladt, 1996)
- Les coumarines et les flavones méthylées apparaissent bleu ou Pourpre (Dawson *et al.* 1991 cité par Wagner et Bladt, 1996).

Dans le but d'identifier ces différentes classes de métabolites secondaires, il est indispensable de procéder à des révélations des CCM avec des réactifs tels que :

- KOH, $(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Pb}$ et NH_3 spécifiques aux coumarines,
- Les réactifs de Neu, Godin, AlCl_3 et NH_3 spécifiques aux flavonoïdes.

Lors de notre étude nous avons utilisé le réactif de Neu qui révèle les flavonoïdes sous différentes couleurs tels que l'orange, le rouge et le jaune. La classe des acides hydroxycinnamiques et de leurs esters apparaît sous une couleur bleu vert (Tahrouch, 1992 ; Wagner et Bladt, 1996) avec ce réactif. La confrontation de toutes ces données bibliographiques à nos résultats permet de conclure que les taches révélées pourraient correspondre aux flavonoïdes et aux acides hydroxycinnamiques ainsi qu'à leurs esters. Ces molécules sont à la base de l'activité antibactérienne et antioxydante de plusieurs plantes médicinales et aromatiques (Drissa *et al.* 2004).

Concernant la CMI, les résultats obtenus ont montré que celle-ci est relativement faible puisqu'elle est de l'ordre de $3,125 \text{ mg ml}^{-1}$ pour *Rubus ulmifolius*, *Pistacia atlantica* et *Anvillea radiata* ; alors que pour *Cistus monspeliensis*, *C. crispus*, *Lavandula coronopifolia*, *L. stoechas* et *Rosa canina* cette CMI est de l'ordre de $6,25 \text{ mg ml}^{-1}$. Cela nous amène à penser que les PAM sélectionnées sont efficaces en termes d'inhibition de la croissance de *C. m. subsp. Michiganenesis*. En fait, les valeurs de CMI ainsi que de CMB citées dans la littérature sont très variables. Ainsi, Bouamama *et al.* (2006) ont rapporté que la CMI des extraits des feuilles de *Cistus monspeliensis* et *C. villosus* est comprise entre 0,78 et 50 mg ml^{-1} . Sarah *et al.* (2012) ont montré que la CMI de l'extrait méthanolique des feuilles de *Psidium guajava* varie entre 0,391 et $1,563 \text{ mg ml}^{-1}$ selon les agents phytopathogènes. En effet, en présence d'une série d'agents pathogènes chez l'homme, la CMI de l'extrait aqueux des fruits d'une seule espèce de PAM (*Rosa canina*) varie de 3,5 à 25 mg/ml (Montazeri *et al.* 2011). Il en est de même lors de l'analyse de l'effet des échantillons d'*Urtica dioica* (CMI oscille entre 0,13 et 66 mg/ml) (Modarresi-Chahardehi *et al.* 2012). Cette distribution différentielle des valeurs CMI dans la littérature est liée à la sensibilité de la souche bactérienne testée, à l'efficacité de la PAM utilisée mais elle est aussi très influencée par le protocole et le solvant d'extraction ainsi que le type d'organe utilisé (Montazeri *et al.* 2011 ; Modarresi-Chahardehi *et al.* 2012). Les genres ayant la plus importante activité antibactérienne contre *C. m. subsp. michiganenesis* sont également actifs contre d'autres agents pathogènes, aussi bien en pathologie humaine qu'en phytopathologie (Montazeri *et al.* 2011 ; Lee *et al.* 2012 ; Tomas-Menor *et al.* 2013 ; Hosseini 2013). Comme *C. m. subsp. michiganenesis* est transmissible par les semences (Gittaitis *et al.* 1993), l'application des extraits aqueux pourrait engendrer une large activité protectrice contre cet agent pathogène. En effet, nos résultats sont en accord

avec ce constat étant donné que le traitement des semences par les extraits des trois plantes testées (*Lavandula coronopifolia* (78) *Cistus monpeliensis* et *Rubus ulmifolius*), a entraîné une réduction significative de l'inoculum du pathogène à la surface des semences. L'utilisation, des produits chimiques et des antibiotiques, mais surtout certaines formulations combinées des deux induisent une réduction spectaculaire de la population de *C. m. subsp. michiganensis* (0 ; 0,032% ; 0,083% ; et 0,8%) (De Leon *et al* 2008 b ; Pouvova *et al* 2008; Milijasevic *et al* 2009). Cependant cela ne constitue pas une mesure radicale de l'élimination du pathogène. En effet, les problèmes de résistances aux antibiotiques, de toxicité majeure des produits chimiques initialement pulvérisée sur la surface des graines de tomate limitent l'utilisation de ces molécules.

Concernant l'effet des extraits aqueux sur la germination des graines Bonzi *et al.* (2012) ont montré que l'extrait aqueux de *C. citratus* réduit sensiblement la transmission de *P. sorghina* par rapport aux graines non traitées et ceux traités avec un fongicide. Cependant, l'extrait aqueux de *C. citratus* abaisse la germination des graines de sorgho (*Sorghum bicolor*) par rapport aux semences non traitées, les semences traitées avec de l'eau et ceux traités avec un fongicide. Nos résultats (obtenus avec les extraits des plantes sélectionnées), montrent aussi bien une efficacité dans la réduction de *C. m. subsp. michiganensis* qu'une augmentation de germination des graines de tomate; Ceci est en accord avec les observations de Roy *et al.* (2012) qui ont montré que l'extrait aqueux des feuilles de *Terminalia bellirica* entraîne une augmentation de la germination des graines et améliore la croissance de la longueur des tiges et des racines du chou de marais (*Impoeta aquatica*) et le gombo (*Hibiscus esculentus*). Il faut noter que Nwachukwu *et al* (2001) avaient déjà rapporté que les extraits (bruts et aqueux) des feuilles de plantes (*Ocimum basilicum*, *Vernonia amygdalina*, *Azadirachta indica* et *Carica papaya*) réduisent significativement l'incidence des principaux champignons pathogènes transmis par les semences et augmentent la germination des graines du haricot africain (*Sphenostylis stenocarpa*). Cette amélioration de la germination des graines pourrait être expliquée par une accélération du processus de solubilisation des téguments des semences d'une part et par l'effet qu'auraient ces extraits sur le pH du milieu (Chachalis et Reddy 2000).

Par ailleurs, notons que tous les échantillons des PAM testées ici sont disponibles dans la région de Souss-Massa-Draa et y poussent très facilement. En outre, la méthode d'extraction adoptée est très simple utilisant le solvant le plus accessible et le moins coûteux, à savoir l'eau (Talibi *et al.* 2011 ; Talibi *et al.* 2012).

V- Conclusions et perspectives

L'application des micro-organismes et/ou de substances naturelles pour le contrôle ou la suppression de population d'agents nuisibles ou pathogènes a été récemment imposée par des directives gouvernementales afin de minimiser voir même éradiquer l'utilisation des pesticides chimiques vu les préoccupations du grand public relatives d'une part au problème de résistance aux pesticides chimiques (Martineza *et al.* 2013) et d'autre part, aux conséquences néfastes des résidus chimiques aussi bien sur l'environnement que sur la santé humaine (Whipps et Lumsden, 2001). C'est ainsi que plusieurs biopesticides ont été récemment formulés (Hynes et Boyetchko, 2006)

La recherche entamée dans ce cadre nous permet de conclure que le Sud du Maroc et spécialement la région de Souss Massa Draa, est riche en PAM possédant une importante activité antibactérienne envers *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Les meilleurs résultats sont obtenus avec les plantes appartenant aux genres : *Lavandula*, *Rubus*, *Rosa*, *Cistus*, *Pistacia* et *Anvillea*. L'étude de l'impact de ces plantes sur la viabilité de *C. m.* subsp. *michiganensis* révèle que les meilleures plantes ont à la fois une action bactériostatique et bactéricide. En outre, le traitement des semences de tomate avec les extraits aqueux des meilleures plantes sélectionnées ne présente aucun effet négatif sur la germination, mais au contraire l'améliore, et réduit significativement l'inoculum du pathogène à la surface de semences artificiellement inoculées. Une corrélation positive a été mise en évidence entre l'activité antibactérienne et la teneur en flavonoïdes et en phénols. Ces résultats sont prometteurs et peuvent contribuer au développement dans l'avenir de biopesticides naturels pour le contrôle du chancre bactérien de la tomate. La mise au point d'un procédé fiable de traitement des semences avec les PAM, ou leurs composés bioactifs, afin d'éliminer ou de réduire l'inoculum initial du pathogène sur les semences constitue une application très intéressante. La réussite de ce procédé aidera à obtenir des semences indemnes de ce pathogène. Cette certification est indispensable au commerce des semences de tomate à l'échelle internationale. D'autres études sont nécessaires pour compléter et confirmer ces résultats, à savoir:

- Evaluer l'effet inhibiteur d'autres extraits (organiques: méthanolique, hexanique, chloroformique, etc) sur l'agent pathogène ;
- Evaluer l'activité biologique des huiles essentielles (HE) ;
- Caractériser les meilleures HE par chromatographie en phase gazeuse-couplée à une spectrométrie de masse;

- Extraire et identifier les molécules responsables de l'activité biologique ;
- Mettre au point une technique d'enrobage des semences avec les meilleurs extraits
- Evaluer le degré de contrôle *in vivo* du chancre bactérien après le traitement des semences avec les meilleurs extraits.
- Evaluer l'effet combiné des PAM et des antagonistes dans le contrôle du chancre bactérien de la tomate.

En effet, la possibilité de combiner les méthodes biologiques demeure un facteur important pour promouvoir l'utilisation de la lutte biologique. Cette approche peut offrir des outils puissants et fiables pour la lutte biologique contre les principaux problèmes phytosanitaires dans les cultures. En effet Bardin *et al.* (2008) ont rapporté que des formulations séparées à base d'extrait végétal de *Reynoutria sachalinensis* (Milsana) et du champignon *Microdochium dimerum* présentent une grande efficacité dans le contrôle respectif de l'oïdium et de *B. cinerea* affectant la culture de la tomate sous serre. Ces auteurs ont montré que ces deux traitements sont compatibles étant donné que leur combinaison n'altère pas leurs efficacités respectives.

Conclusion générale et perspectives

Le chancre bactérien est l'un des principaux problèmes phytosanitaires de la tomate. De nouvelles émergences sont toujours enregistrées partout dans le monde (De Léon *et al.* 2011). Au Maroc aucune zone de production de la tomate n'échappe à cette maladie. Dans la région du Souss-Massa Draa, cette bactériose vasculaire est la principale cause de la mort prématurée des plants et de la réduction des rendements (Fatmi *et al.* 1984). Aucune variété n'est totalement résistante au chancre bactérien et bien qu'une variété de traitements chimiques soit disponible, leur efficacité est très contestée d'une part à cause, des dangers qu'ils présentent pour la santé du consommateur et pour l'environnement et d'autres parts parce qu'ils ne font que réduire la population du pathogène à la surface des plants infectés. Le recours à la lutte biologique et/ou intégrée par utilisation des *Pseudomonas* spp. fluorescents antagonistes et certains extraits des PAM a permis le contrôle de plusieurs pathogènes de plantes en culture. Dans cette optique, Ces stratégies de lutte révolutionnaires et conciliantes avec l'environnement nous ont paru très attrayantes et méritent largement d'être investiguées en termes de lutte contre l'agent du chancre bactérien de la tomate. Les objectifs de la présente étude étaient d'isoler, à partir de la rhizosphère des plantes de tomate, des *Pseudomonas* spp. fluorescents antagonistes de *C. m. subsp. michiganensis*, d'évaluer leur efficacité *in vivo* (en pots sous serre et dans les conditions de production) et de les identifier. Notre intérêt s'est porté également sur le screening de 40 PAM originaires du Sud Marocain en vue de leur utilisation en lutte biologique contre cette bactériose. Pour ce faire, nous avons d'abord procédé à un screening des isolats de l'agent pathogène. Ceci nous a permis de sélectionner deux isolats CmmH195 et CmmJS07 à base de leur activité de virulence élevée. En effet ces deux souches, isolées de la région de Souss-Massa-Draa, ont développé des réactions d'hypersensibilité sur feuille de tabac dans 100% des cas. Ces deux isolats ont été utilisés pour évaluer le degré de protection des plants de tomate contre *C. m. subsp. michiganensis* lors de l'application des *Pseudomonas* spp. fluorescents comme antagonistes et également lors de l'utilisation des extraits des PAM. Par la suite, nous avons procédé à la recherche et au screening des antagonistes à *C. m. subsp. michiganensis*. Ceci nous a permis de constituer une grande collection de 303 isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents antagonistes dont 14% (42 isolats) sont de bons colonisateurs des racines de la tomate. Les isolats qui forment cette collection sont tous originaires de la région du Souss-Massa Draa.

Le criblage des antagonistes sélectionnés à l'aide du test de dessèchement des cotylédons a permis la sélection de huit isolats, lesquels ont significativement réduit l'incidence du dessèchement des cotylédons. L'efficacité de ces huit isolats sélectionnés a été vérifiée également en pots sous serre. Deux isolats RN39e et RN69 remarquables ont été retenus et les essais conduits en plein champ ont confirmé leurs potentiels antagoniste et protecteur. Par ailleurs, nous avons constaté également un remarquable effet potentialisant de la croissance surtout dans les premiers stades de la culture. L'action *in vitro* de certains facteurs abiotiques à savoir la température, le PH et les sels sur la croissance des deux meilleurs isolats RN 39e et RN69 a été évaluée. Les résultats obtenus montrent que ces deux isolats sont doués de grandes capacités de résistance aux différents facteurs testés. L'identification génétique des meilleurs isolats du genre *Pseudomonas* est réalisée par séquençage de l'ARNr 16S et celui du gène *rpoB*. Les résultats obtenus ont permis de confirmer l'hétérogénéité de notre collection puisque nous avons pu distinguer deux principaux groupes à savoir le groupe de *P. azotoformans* et le groupe de *P. plecoglossicida* auxquels nos souches seraient fortement apparentées. Levenfors *et al.* 2013 ont récemment rapporté qu'une nouvelle espèce de *Pseudomonas* spp. fluorescente dite *P. azotoformans* améliore le développement et l'émergence des plantes. *P. plecoglossicida* est associé à l'amélioration de la croissance des plantes ainsi qu'au contrôle biologique des phytopathogènes (Naik *et al.* 2008, Jha *et al.* 2009). Ces capacités promotrices de la croissance des plantes ainsi que l'activité biologique de cette espèce sont probablement supportées par l'aptitude de cette espèce à solubiliser le phosphate, à produire les sidérophores, l'AIA, la protéase, la cellulase et l'HCN (Naik *et al.* 2008, Jha *et al.* 2009).

Le deuxième axe que nous avons développé lors de cette étude, en termes de lutte biologique contre le chancre bactérien, est le screening des extraits aqueux des plantes aromatiques et médicinales originaires du sud marocain pour leur pouvoir antagoniste envers l'agent de cette bactériose. Les essais réalisés *in vitro* avec les extraits aqueux de 40 plantes ont montré que certaines déploient un effet inhibiteur élevé vis-à-vis de *C. m.* subsp. *michiganensis*. Les meilleurs résultats sont obtenus avec les plantes appartenant aux genres *Lavandula*, *Rubus*, *Rosa*, *Cistus*, *Pistacia* et *Anvillea*. Le traitement des semences de tomate, infectées par *C. m.* subsp. *michiganensis*, par les extraits de ces plantes n'a pas altéré leur pouvoir germinatif et nous avons même remarqué une réduction significative de la population du pathogène à la surface des semences traitées.

Une analyse phytochimique préliminaire est réalisée pour les 40 plantes testées. Les résultats obtenus montrent que les extraits des meilleures PAM sont riches en composés phénoliques et présentent également une remarquable activité antioxydante. Une corrélation linéaire significative a été relevée entre l'activité biologique des extraits aqueux des PAM et la richesse en composés phénoliques et surtout en flavonoïdes.

Tous ces résultats permettent de conclure que la lutte biologique contre l'agent du chancre bactérien de la tomate est envisageable par l'utilisation aussi bien des *Pseudomonas* spp. fluorescents que des extraits des PAM. L'utilisation de mixtures préparées à base des meilleurs *Pseudomonas* fluorescents antagonistes et des molécules extraites des meilleures PAM pourrait aboutir à la mise en place d'une formulation ayant à la fois les propriétés d'un bio pesticide et d'un biofertiliseur. D'autres études sont nécessaires pour confirmer nos résultats et compléter nos connaissances dans le cadre de la détermination précise des mécanismes d'action des *Pseudomonas* spp. fluorescents d'une part et la caractérisation phytochimique détaillée des meilleures PAM de notre collection par l'utilisation des techniques d'analyse plus performantes. Cependant, on pourrait dans un futur proche, procéder à quelques essais et applications simples des connaissances acquises à travers ce travail ; on cite en particulier :

- L'application au champ des deux meilleurs isolats RN39e et RN69 selon deux phases, d'abord par enrobage des semences ensuite par immersion des racines dans une solution à base de ces antagonistes. Cette approche présente un intérêt certain d'une part du fait que ces isolats exercent une action protectrice importante comme agents de bio-contrôle et comme stimulateurs de la vigueur des plantes et d'autre part parce que ces isolats ne sont pathogènes ni pour les plantes ni pour l'homme. Cette stratégie ciblée est relativement garantie étant donné que tous les tests de bio contrôle ont été réalisés à l'encontre des isolats d'agents pathogènes ancien (Cmm H195) ou nouveau (Cmm JS07) isolés localement c'est à dire à partir des champs de culture de tomate de la région de Souss-Massa Draa. Enfin, la stabilité relative de RN39e et RN69 semble pouvoir être maintenue grâce à leurs propriétés intéressantes de tolérance face aux stress liés à la salinité ou aux variations de T° et de pH.

- La coculture de la tomate au champ avec des plants de *Lavandula* provenant des sites ou ont été prélevés les spécimens ayant donné les meilleurs résultats (pouvoir inhibiteur élevé et activité antioxydante remarquable). Si on tient compte des exigences de la culture de la lavande, à savoir l'ensoleillement et la légèreté du sol, qui sont parfaitement compatibles avec celles de la culture de la tomate dans la région de Souss-Massa Draa, cette démarche semble très prometteuse. Ceci est d'autant plus attrayant étant donné les bienfaits multiples des représentants de ce genre sur la santé de l'homme (antiseptique, sédative, relaxante, hypotensive...etc.) et contre d'autres phytopathogènes.

- L'utilisation des meilleures plantes inhibitrices ou de leurs extraits comme amendement des sols avant la plantation de la tomate pourrait être une démarche prometteuse pour combattre le chancre bactérien. D'autant plus que les populations du pathogène qui restent dans le sol et au niveau des débris contaminés constituent un moyen de propagation de cette bactériose.

Références bibliographiques

- Abo-Elyousr, K. A., Hashem, M., Ali, E. H., 2009.** Integrated control of cotton root rot disease by mixing fungal biocontrol agents and resistance inducers. *Crop Protection*, 28(4) : 295-301.
- Adékambi, T., Shinnick, T. M., Raoult, D., & Drancourt, M., 2008.** Complete *rpoB* gene sequencing as a suitable supplement to DNA–DNA hybridization for bacterial species and genus delineation. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58 (8): 1807-1814.
- Adékambi, T., Drancourt, M., Raoult, D., 2009.** The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends in microbiology*, 17(1): 37-45.
- Ait Tayeb, L., Ageron, E., Grimont, F., Grimont, P. A. D., 2005.** Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. *Research in Microbiol.* 156(5): 763-773.
- Alarcón, C., Castro, J., Muñoz, F., Arce-Johnson, P., Delgado, J., 1998.** Protein (s) from the gram-positive bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* induces a hypersensitive response in plants. *Phytopathol.* 88(4) : 306-310.
- Alemanno, L., Ramos, T., Gargadenec, A., Andary, C., Ferriere, N., 2003.** Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. *Annals of botany*, 92(4) : 613-623.
- Ali-Emmanuel N., Moudachirou M., Akakpo A. J., Quetin-Leclercq J., 2002.** Activités antibactériennes *in vitro* de *Cassia alata*, *Lantana camara* et *Mitracarpus scaber* sur *Dermatophilus congolensis* isolé au Bénin. *Revue Élev. Méd. Vét. Pays Trop.* 55 (3): 183-187.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J., 1997.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids Res.* 25 (17): 3389-3402.
- Alvarez, A. M. 2004.** Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 339-366.
- Alvarez, A. M., Adams, P. D., 1999.** Flow cytometry: A promising tool for seed health testing. Pages 93-97 in: Proc. 3rd Int. Seed Health Sympos. International Seed Testing Association.
- Alvarez, A. M., Derie, M., Benedict, A., Gabrielson, R., 1993.** Characteristics of a monoclonal antibody to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. (Abstr.) *Phytopathology* 83:1405.
- Alvarez, A. M., Kaneshiro, W. S., Vine, B. G., 2005.** Diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* populations in tomato seed: What is the significance? *Acta Hortic.* 695: 205-214.
- Ameziane, N., Boubaker, H., Boudyach, H., Msanda, F., Jilal, A., Ait Benaoumar, A., 2007.** Antifungal activity of Moroccan plants against citrus fruit pathogens. *Agron. Sustain. Dev.* 27: 273-277.
- Amkraz N., Boudyach E. H., Boubaker H., Bouizgarne B., Ait Ben Aoumar A., 2010.** Screening for fluorescent pseudomonades, isolated from the rhizosphere of tomato, for

- antagonistic activity toward *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26 (6): 1059-1065.
- Anderson, A. J., Guerra, D., 1985.** Responses of bean to root colonization with *Pseudomonas putida* in a hydroponic system. *Phytopathology*, 75(9): 992-995.
- Andreote, F. D., de Araújo, W. L., de Azevedo, J. L., van Elsas, J. D., da Rocha, U. N., van Overbeek, L. S., 2009.** Endophytic colonization of potato (*Solanum tuberosum* L.) by a novel competent bacterial endophyte, *Pseudomonas putida* strain P9, and its effect on associated bacterial communities. *Applied and environmental microbiology*, 75(11) : 3396-3406.
- Andrés, J. A., Rovera, M., Guiñazú, L. B., Pastor, N. A., & Rosas, S. B., 2011.** Role of *Pseudomonas aurantiaca* in Crop Improvement. In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses* (pp. 107-122). Springer Berlin Heidelberg.
- Annette, E., Bazows, H. A., Haulser, W. J. Shadomy, J., 1985.** Manual of clinical microbiology, th edn. American Society for microbiology, Washington, DC.
- Anitha, A., Arun Das, M., 2011.** Activation of rice plant growth against *Rhizoctonia solani* using *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma* and Salicylic Acid. *Research in Biotechnology*, 2(4) : 7-12.
- Anonyme 1,** (<http://www.legume-fruit-maroc.com/tomate-sous-abri.php>, page visitée le 04/01/2013).
- Anonyme 2,** FAOSTAT, URL <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>. Aout 2012.
- Anonyme 3,** Le marché mondial de la tomate. Bulletin de l'établissement autonome de contrôle et de coordination des exportations, ministère de l'agriculture et des pêches maritimes 2011.
- Anonyme 4,** situation de l'agriculture marocaine - N°9 - Novembre 2011
- Anonyme 5,** Office Régional de Mise en Valeur Agricole du Souss-Massa Draa, service de la production agricole. Bulletin officiel 2012.
- Anonyme 6,** l'ISHI (SPN-B004 version 9, 2010) (<http://www.worldseed.org>) ou Naktuinbouw (<http://www.naktuinbouw.nl/node/1415>)
- Anonyme 7,** Method for detectin of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato seed International seed federation, version 4, August 2011.
- Anonyme 8,** Strategie nationale de developpement du secteur des plantes aromatiques et medicinales au maroc, 2009. Rapport final de la coordination entre le haut commissariat aux eaux et forets et à la lutte contre la désertification et l'agence américaine pour le développement international (USAID).
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J. Y., Wakabayashi, H., Oyaizu, H., 2000.** Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Inter. J. Syst. and Evol. Microbiol.*, 50(4): 1563-1589.

- Arima, H., Ashida, H., Danno, G., 2002.** Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66:1009–1014.
- Askarne, L., Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E. H., Msanda, F., Saadi, B., Ait Ben Aoumar, A., 2012.** In vitro and in vivo antifungal activity of several Moroccan plants against *Penicillium italicum*, the causal agent of citrus blue mold. *Crop Protection.* 40: 53-58.
- Askarne, L., Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E. H., Msanda, F., Saadi, B., Ait Ben Aoumar, A., 2013.** Use of Moroccan medicinal plant extracts as botanical fungicide against citrus blue mould. *Letters in applied microbiology*, 56 (1), 37-43.
- Atanasova, M., Ribarova, F., 2009.** Phénols et flavonoïdes totaux dans les extraits secs des feuilles des bouleaux argentés bulgares (*Betula pendula*). *Revue de génie industriel* 4: 21-25.
- Attitala, I. H., Bataw, A. A., Borowicz, J. J., Brishammar, S., 2007.** 16S rDNA analysis for characterisation of *Pseudomonas* strain MF30 isolated from *Rumex acetocella* roots in northern Sweden. *Arab J. Biotech.* 10 (1): 97-106.
- Bach, H. J., Jessen, I., Schlöter, M., and Munch, J. C. 2003.** A TaqMan-PCR protocol for quantification and differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies. *J. Microbiol. Methods.* 52: 85-91.
- Baer, D., Gudmestad, N. C., 1995.** In vitro cellulolytic activity of the plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Can. J. Microbiol.* 41: 877-888.
- Bahme J. B., Schorth M. N., 1987.** Spatial-temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potato. *Phytopathology* 77(7): 1093-1100.
- Bahri-Sahloul, R., Ammar, S., Fredj, R. B., Saguem, S., Grec, S., Trottin, F., Skhiri, F.H., 2009.** Polyphenol contents and antioxidant activities of extracts from flowers of two *Crataegus azarolus* L. varieties. *Pak. J. Biol. Sci.*, 12: 660-668.
- Balestra, G. M., Heydari, A., Ceccarelli, D., Ovidi, E., & Quattrucci, A., 2009.** Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. *Crop Protection*, 28 (10): 807-811.
- Bardas, G. A., Lagopodi, A. L., Kadoglidou, K., & Tzavella-Klonari, K., 2009.** Biological control of three *Colletotrichum lindemuthianum* races using *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 and *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Biological Control*, 49(2), 139-145.
- Bardin M., Fargues J., Nicot, P.C., 2008.** Compatibility between biopesticides used to control grey mould, powdery mildew and whitefly on tomato. *Biological Control* 46: 476–483.
- Barnett, S. J., Singleton, I., Ryder, M., 1999.** Spatial variation in population of *Pseudomonas Corrugata* 2140 and *Pseudomonads* on take-all diseased and healthy root systems of wheat. *Soil Biol. Biochem.* 31:633–636.
- Bashan, Y., Puente, M. E., Rodriguez-Mendoza, M. N., Toledo, G., Holguin, G., Ferrera-Cerrato, R., & Pedrin, S., 1995.** Survival of *Azospirillum brasilense* in the Bulk Soil

- and Rhizosphere of 23 Soil Types. *Applied and environmental microbiology*, 61(5) : 1938-1945.
- Basim E., Basim H., 2004.** Evaluation of Antibacterial Activity of Essential Oil of *Rosa damascena* on *Erwinia amylovora*. *Phytoparasitica* 32(4): 409-412.
- Basim, E., Basim, H., Ozcan, M., 2006.** Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering* 77: 992-996.
- Baysal, Ö., Gursoy, Y. Z., Ahmet Duru, H. O., 2005.** Enhanced tomato resistance to bacterial canker by application of turtle oil. *J. Gen. Plant Pathol.* 71:204–210.
- Baysal, Ö., Mercati, F., İkten, H., Yildiz, R. Ç., Carimi, F., Aysan, Y., Teixeira da Silva, J. A., 2011.** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: Tracking strains using their genetic differentiations by ISSR markers in Southern Turkey. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 75(3): 113-119.
- Becker J .O., Cook R. J., 1988.** Role of siderophores in suppression of *Pythium species* and production of increased-growth of wheat by fluorescent *Pseudomonad*. *Phytopathology*, 78(6) : 778-782.
- Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Erler, W., Burghardt, J., & Seyfarth, W. (1999).** A taxonomic study of bacteria isolated from grasses: a proposed new species *Pseudomonas graminis* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 49(1), 297-308.
- Behrendt, U., Schumann, P., Meyer, J. M., Ulrich, A., 2009.** *Pseudomonas cedrina* subsp. *fulgida* subsp. nov., a fluorescent bacterium isolated from the phyllosphere of grasses; emended description of *Pseudomonas cedrina* and description of *Pseudomonas cedrina* subsp. *cedrina* subsp. nov. *Inter. J. Syst. & Evol. Microbiol.* 59 (6): 1331-1335.
- Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., 2003.** Fluorescent pseudomonads associated with the phyllosphere of grasses; *Pseudomonas trivialis* sp. nov., *Pseudomonas poae* sp. nov. and *Pseudomonas congelans* sp. nov. *Inter. J. Syst. and Evol. Microbiol.*, 53(5): 1461-1469.
- Beimen, A., Bermpohl, A., Meletzus, D., Eichenlaub, R., Barz, W., 1992.** Accumulation of phenolic compounds in leaves of tomato plants after infection with *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* strains differing in virulence. *Z. Naturforsch.*, 47C: 898-909.
- Benabid, A., 2000.** Flore et écosystème du Maroc. Edit. Ibis Press. pp.357.
- Benhamou, N., 1991.** Cell surface interactions between tomato and *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*: localization of some glycoproteins in infected host leaf tissues. *Phys. Mol. Plant Pathol.* 38: 15-38.
- Benhamou, N., Picard, K., 1999.** La résistance induite: une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. *Phytoprotection*. 80 (3) :137-168.

- Benizri, E., Courtade, A., Guckert, A., 1995.** Fate of two microorganisms in maize simulated rhizosphere under hydroponic and sterile conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(1), 71-77.
- Benjilali, B., Zrira, S., 2005.** Plantes aromatiques et médicinales atouts du secteur et exigences pour une valorisation durable. Actes éditions. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc.
- Bennasar, A., Mulet, M., Lalucat, J., García-Valdés, E., 2010.** PseudoMLSA: a database for multigenic sequence analysis of *Pseudomonas* species. *BMC Microbiol.* 10 (1): 118.
- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R. A., Ulrich, A., Hallmann, J., 2005.** Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 51(2): 215-229.
- Berger, G., 1942.** Une bactériose de la tomate nouvellement observée au Maroc. *Ann Epiphyt* 8:177–187.
- Berti, V., 1989.** J'aime les tomates. Les éditions de l'homme. pp. 156.
- Bonzi S., Somda, I., Zida, E., Sereme, P., Adam, T., 2012.** Effects of plant aqueous extract of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. on Sorghum seed germination and it efficacy in controlling *Phoma sorghina* (Sacc.) Boerema Dorenbosh and Van Kesteren transmission from naturally infected seed to sorghum plant organs and grains in field. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45 (20): 2429-2436.
- Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X., Gardan, L., 2000.** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*, 20(1): 51-63.
- Bouamama, H., Noël, T., Villard, J., Benharref, A., Jana, M., 2006.** Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. *J. of Ethnopharma.* 104: 104–107.
- Boubyach, E. H., Fatmi, M., Akhayat, O., Benizri, E., Ait Ben Aoumar, A., 2001.** Selection of antagonistic bacteria of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and evaluation of their efficiency against bacterial canker of tomato. *Biocontrol. Sci. Tech.* 11: 141–149.
- Boudyach, E. H. 2004.** Lutte biologique contre le chancre bactérien de la tomate : sélection des bactéries antagonistes à *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* et évaluation de leur efficacité dans le contrôle du chancre bactérien. Thèse D'état Es-sciences. Option phytopathologie. Faculté des sciences d'Agadir, Maroc. pp134.
- Boudyach, E. H., Fatmi, M., Boubaker, H., Ait Ben Aoumar, A., Akhayat, O., 2004.** Effectiveness of fluorescent pseudomonads strains HF 22 and HF 142 to control bacterial canker of tomato. *J. Food. Agr. Environ.* 2 (3&4):115-120.
- Bouizgarne B., 2013.** Bacteria for Plant Growth Promotion and Disease Management. In *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management* (pp. 15-47). Springer Berlin Heidelberg.

- Boulogne, I., Petit, P., Ozier-Lafontaine, H., Desfontaines, L., Loranger-Merciris, G., 2012.** Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 10(4), 325-347.
- Bouzerda, L., Boubaker, H., Boudyach, E. H., Akhayat, O., Ait Ben Aoumar, A., 2003.** Selection of antagonistic yeasts to green mold disease of citrus in Morocco. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 1, 215-218.
- Bryan, M. E., 1930.** Studies on bacterial canker of tomato. *J. Agri. Res.* 41:825-851.
- Burkett-Cadena, M., Kokalis-Burelle, N., Lawrence, K. S., van Santen, E., Kloepper, J. W., 2008.** Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria. *Biological control*, 47(1): 55-59.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H., 2004.** Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences*, 74(17): 2157-2184.
- Cakir, A., Kordali, S., Kilic, H., Kaya, E., 2005.** Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(3): 245-256.
- Calmel M., 1996.** Etude de la colonisation de la rhizosphère du maïs par une souche de *Pseudomonas fluorescens*. Influence du mode d'inoculation. DEA, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy. pp 43.
- Carlton, W. M., Braun, E. J., Gleason, M. L., 1998.** Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *Phytopathol.* 88: 525-529.
- Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P., Ongena, M., 2011.** Bacillus-based biological control of plant diseases. *Pesticides in the modern world-pesticides and management*, 1, 273-302.
- Chachalis, D., Reddy, K. N. 2000.** Factors affecting *Campsis radicans* seed germination and seedling emergence. *Weed Science* 48 (2): 212-216.
- Chaldecott, M. A., Preece T. F., 1983.** The use of a tomato cotyledon test to identify *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense*. *Plant Pathol.* 32:441-448.
- Chang, R. J., Ries, S. M., Pataky, J. K. 1992 b.** Reductions in yield of processing tomatoes and incidence of bacterial canker. *Plant disease*, 76(8), 805-809.
- Chang, R. J., Ries, S. M., Pataky, J. K. 1992 a.** Effects of temperature, plant age, inoculum concentration, and cultivar on the incubation period and severity of bacterial canker of tomato. *Plant disease*, 76(11), 1150-1155.
- Chang, R. J., Ries, S. M., Pataky, J. K., 1991.** Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathol.* 81(10) : 1276-1281.
- Chang, R. J., Ries, S. M., Pataky, J. K., 1992 a.** Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. *Phytopathol.* 82: 553-560.

- Chao, W., L., Nelson, E. B., Harman, G., E. Hoch, H., C., 1986.** Colonization of rhizosphere by biological control agents applied to seeds. *Phytopathol.* 76(1): 60-65.
- Chin-A-Woeng, T. F., Bloembergen, G. V., van der Bij, A. J., van der Drift, K. M., Schripsema, J., Kroon, B., ... Lugtenberg, B. J., 1998.** Biocontrol by phenazine-1-carboxamide producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular plant/microbe interactions*, 11(11): 1069-1077.
- Chitarra, L., G., Breeuwer, P., Van den Bulk, R. W., Abee, T., 2000.** Rapid fluorescent assessment of intracellular pH as a viability indicator of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *J. Appl. Microbiol.* 88:809-816.
- Cirvilleri, G., Bonaccorsi, A., Scuderi, G., Scortichini, M., 2005.** Potential biological control activity and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains. *Journal of Phytopathology*, 153(11-12): 654-666.
- Collins, M. D., Bradbury, J. F., 1986.** Plant pathogenic species of *Corynebacterium*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2: 1267-1283.
- Compeau, G., Al-Achi, B. J., Platsouka, E., Levy, S. B., 1988.** Survival of rifampin-resistant mutants of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in soil systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10): 2432-2438.
- Comstock; Alberg; Huang, 2008.** The Risk of Developing Lung Cancer Associated with Antioxidants in the Blood: Ascorbic Acid, Carotenoids, α -Tocopherol, Selenium, and Total Peroxyl Radical Absorbing Capacity. *American journal of epidemiology*. 168 : 831-840 (Abstract).
- Cook, R. J., 1993.** Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:53-80.
- Courtade, A., 1997.** Etude des interactions plante / microorganismes dans le modèle maïs-*Pseudomonas fluorescens* M.3.1 – *Fusarium roseum*. Thèse de Doctorat de l'institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France. 178pp.
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., Polissiou, M. G., 2003.** The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop protection*, 22(1): 39-44.
- Davies, J. N., Hobson, G. E., McGlasson, W. B. (1981).** The constituents of tomato fruit: the influence of environment, nutrition, and genotype. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 15(3): 205-280.
- Davis, M. J., Gillaspie, A. G., Vidaver, A. K. , Harris, R. W., 1984.** *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease.. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:107-117.
- De León, L., Rodríguez, A., López, M. M., Siverio, F., 2008 (a).** Evaluation of the efficacy of immunomagnetic separation for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *J. Appl. Microbiol.* 104:776-786.

- De León, L., Siverio, F., López, M. M., Rodríguez, A., 2008 (b).** Comparative efficiency of chemical compounds for in vitro and in vivo activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomato bacterial canker. *Crop Protection*, 27(9), 1277-1283.
- De León, L., Siverio, F., López, M. M., Rodríguez, A., 2011.** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seed borne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant Disease*, 95(11), 1328-1338.
- De León, L., Siverio, F., Rodríguez, A., 2006.** Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds using immunomagnetic separation. *J. Microbiol. Methods* 67:141-149.
- De Oliveira, A. M. F., Pinheiro, L. S., Pereira, C. K. S., Matias, W. N., Gomes, R. A., Chaves, O. S., de Fátima, M., de Souza, V., de Almeida, R. N., de Assis, T. S., (2012).** Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Some Malvaceae Family Species. *Antioxidants* (1): 33-43.
- De Pinto, M. C., Lavermicocca, P., Evidente, A., Corsaro, M. M., Lazzaroni, S., De Gara, L., 2003.** Exopolysaccharides produced by plant pathogenic bacteria affect ascorbate metabolism in *Nicotiana tabacum*. *Plant and cell physiology*, 44(8) : 803-810.
- Devi, S. I., Talukdar, N. C., Sharma, K. C., Jeyaram, K., Rohinikumar, M., 2011.** Screening of Rhizobacteria for Their Plant Growth Promotion Ability and Antagonism Against Damping off and Root Rot Diseases of Broad Bean (*Vicia faba* L.). *Indian J. of Microbiol.* 51(1): 14-21.
- DeWeger, L. A., VanAnrendonk, J. J. C. M., Kees Recourt, Gerard, A. J., Van Der Hofstad, M., Weisbeek, P. J., Lugtenberg, B., 1988.** Siderophore-mediated uptake of Fe^{3+} by the plant growth-stimulating *Pseudomonas putida* strains WCS358 and other rhizosphere microorganisms. *J. of bacteriology* : 4693-4698.
- Dey, R., Pal, K. K., Bhatt, D. M., Chauhan, S. M., 2004.** Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiol Res* 159: 371-394.
- Digat, B. 1988.** Stratégies de la bactérisation par les rhizobactéries1. *EPPO Bulletin*, 18(1) : 29-35.
- Digat, B., 1989.** La bacterisation des semences: possibilités et perspectives. *Bulletin de la Fédération Nationale des Agriculteurs Multiplicateurs de Semences* 108 : 10-13.
- Digat, B., 1992.** Contrôle biologique et stimulation de la germination par la bactérisation [PGPR (plant growth promoting rhizobacteria), EPR (emergence promotion rhizobacteria)]. *Phytoma La Defense des Vegetaux* (441) : 35-38.
- Digat, B., Expert, J. M., Bissis E., 1993.** Ces bactéries qui protègent et stimulent les semences et les plantules ; PHH Revue horticole 341 : 16-21.
- Dommergues, F., & Mangenot, F. (1970).** Les associations mycorrhiziennes. Ecologie Microbienne du sol. Ed Masson et Cie. Paris: 656-675.

- Dreier, J., Bermpohl, A., and Eichenlaub, R. 1995.** Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 85:462-468.
- Dreier, J., Meletzus, D., Eichenlaub, R. 1997.** Characterization of the plasmid encoded virulence region *pat-1* of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 10, 195-206.
- Duan, J., Jiang, W., Cheng, Z., Heikkila, J. J., & Glick, B. R., 2013.** The Complete Genome Sequence of the Plant Growth-Promoting Bacterium *Pseudomonas* sp. UW4. *PLOS ONE*, 8(3), e58640.
- Durak, İ., Biri, H., Avci, A., Sözen, S., Devrim, E. (2003).** Tomato juice inhibits adenosine deaminase activity in human prostate tissue from patient with prostate cancer. *Nutrition Research*, 23(9) : 1183-1188.
- Ebrahimi, N.S., Hadian, J., Mirjalili, M.H., Sonboli, A., Yousefzadi, M., 2008.** Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phonological stages. *Food chemistry*. 110: 927-931.
- Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. M., Nabavi, S. F., Bahramian, F., Bekhradnia, A. R., 2010.** Antioxidant and free radical scavenging activity of *H. officinalis* L. var. *angustifolius*, *V. odorata*, *B. hyrcana* and *C. speciosum*. *Pak J Pharm Sci*, 23 (1) : 29-34.
- Egamberdiyeva, D., 2007.** The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology*, 36(2), 184-189.
- Eichenlaub, R., Gartemann, K. H., Burger, A., 2006.** *Clavibacter michiganensis*, a group of Gram positive phytopathogenic bacteria. *Plant-Associated Bacteria*, 385-421.
- El Allagui, N., Tahrouch, S., Bourijate, M., Hatimi, A., 2007.** Action de différents extraits végétaux sur la mortalité des nématodes à galles du genre *Meloidogyne* ssp. *Acta Botanica Gallica*, 154(4) : 503-509.
- El Fadl, A., Chtaina, N., 2010.** Etude de base sur la culture de la tomate au Maroc. Programme Régional de lutte intégrée contre les organismes nuisibles (Integrated Pest Management) au Proche Orient (Projet GTFS/REM/070/ITA). pp. 120.
- El Hassany, B., El Hanbali, F., Akssira, M., Mellouki, F., Haidour, A., Barrero, A.F., 2004.** Fitoterapia 75 (6): 573-576.
- El Rhaffari, L., Zaid, A., 2002.** Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. Dans J. Fleurentin (éd.), Des sources du savoir aux médicaments du futur, IRD Editions, Paris : 293-318.
- Elbanna, K., Gamal-Eldin, H., Abuzaed, E., 2010.** Characterization of Egyptian Fluorescent Rhizosphere *Pseudomonad* Isolates with High Nematicidal Activity against the Plant Parasitic Nematode *Meloidogyne Incognita*. *Journal of Biofertilizers Biopesticides* 1(1) : 1-7.
- EPPO/CABI. 2004.** Diagnostic protocols for regulated pests, *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* . **EPPO Bulletin. 2004 34:309–314.**

- EPPO/CABI. 2005.** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. EPPO Bulletin 35 : 275–283. <http://archives.eppo.org/EPPOStandards/diagnostics.htm>.
- Esitken, A., Pirlak, L., Turan, M., & Sahin, F., 2006.** Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrition of sweet cherry. *Scientia Horticulturae*, 110(4): 324-327.
- Fallahzadeh-Mamaghani, V., Ahmadzadeh, M., & Sharifi, R., 2009.** Screening systemic resistance inducing fluorescent *Pseudomonads* for control of bacterial blight of cotton caused by *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Journal of Plant Pathology*, 91(3): 663-670.
- Farley, J. D., 1971.** Recovery of *Corynebacterium michiganense* from overwintered tomato stems by the excised-petiole inoculation method. *Plant Disease Reporter* 55:654–656.
- Fatmi, M., 1989.** Control of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of bacterial canker of tomato. PhD thesis, Univ. of IDAHO, pp. 62.
- Fatmi, M., Eddaoudi, M., Achbani, E., Colin, J., 1984.** Importance du *Corynebacterium michiganensis* pv. *michiganensis* dans la culture de la tomate au Maroc. *Eléments d'épidémiologie. Hommes, terre et eau.* 57 : 9-14.
- Fatmi, M., Schaad, N. W., 1988.** Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato seed. *Phytopathology* 78:121-126.
- Fatmi, M., Schaad, N. W., 2002.** Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathol.* 51: 149–154.
- Fatmi, M., Schaad, N. W., Bolkan H. A., 1991.** Seed treatment for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from naturally infected tomato seeds. *Plante disease* 75(4): 383-385.
- Faure, H., Fayol, V., Galabert, C., Grolier, P., Le Moël, G., Stephens, J.-P., Nabe, F., 1999.** Les caroténoïdes: 2. Pathologie et études de supplémentation. *Annales de Biologie Clinique.* 57 (3), 273-282 *Revue générale* (abstract).
- Fox, G. E., Wisotzkey, J. D., Jurtshuk, P., 1992.** How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42 (1): 166-170.
- Franken, A. A. J. M., Kamminga, G. C., Snijders, W., van der Zouwen, P. S., Birnbaum, Y. E., 1993.** Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds by immunofluorescence microscopy and dilution plating. *Neth. J. Plant Pathol.* 99:125-137.

- Gamalero, E., Martinotti, M. G., Trotta, A., Lemanceau, P., Berta, G., 2002.**
- Franzetti, L., Scarpellini, M., 2007.** Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of Microbiology*, 57(1): 39-47.
- Ftayeh, R. M., von Tiedemann, A., Rudolph, K. W., 2011.** A New Selective Medium for Isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from Tomato Plants and Seed. *Phytopathology*, 101(11), 1355-1364.
- Fu, L., Xia, G., Chun-Yan, X., 2012.** Research Advance in Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Whole Grains. *FOOD SCIENCE*, 33(13): 299-304.
- Fu, L., Xu, B. T., Xu, X. R., Qin, X. S., Gan, R. Y., Li, H. B., 2010.** Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 wild fruits from South China. *Molecules*. 15 (12): 8602-8617.
- Fuiki R., Poinar E. I., Schroth M. N., Hendson M., Wang X. L. and Hancock J.G., 1994.** Spatial colonization patterns and interaction of bacteria on inoculated sugar beet seed. *Phytopathology* 84(11): 1338-1345.
- Gamard, P., Sauriol, F., Benhamou, N., Belanger, R., Paulitz, T., 1997.** Novel butyrolactones with antifungal activity produced by *Pseudomonas aureofaciens* strain 63-28. *Journal of antibiotics*, 50(9): 742-749.
- Gandhi, A., Saravanakumar, K., 2009.** Studies on shelf life of *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus megaterium* and *Pseudomonas fluorescens* in vermicompost carrier. *J Phytol* 1(2):100-107
- Morphogenetic modifications induced by *Pseudomonas fluorescens* A6RI and *Glomus mosseae* BEG12 in the root system of tomato differ according to plant growth conditions. *New phytologist*, 155(2): 293-300.
- Gartemann, K. H., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flügel, M., ... & Bartels, D., 2008.** The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *Journal of bacteriology*, 190 (6) : 2138-2149.
- Gartemann, K. H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R., Burger, A., 2003.** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *J. of Biotech.* 106:179–191.
- Ge, X. T., Li, Y. P., Wan, Z. J., You, M. P., Finnegan, P. M., Banga, S. S., Barbetti, M. J., 2012.** Delineation of *Sclerotinia sclerotiorum* pathotypes using differential resistance responses on *Brassica napus* and *B. juncea* genotypes enables identification of resistance to prevailing pathotypes. *Field Crops Research*, 127: 248-258.
- Geels, F. P., Schippers, B., 1983.** Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *Journal of Phytopathology*, 108(3-4) : 193-206.
- Gees R. et Coffey M. D. 1989.** Evaluation of a strain of *Myrothycium roridum* as a potential biocontrol agent against *phytophthora cinnamomi*: *Phytopathology* 79 (10): 1079-1084.

- Getz, S., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., 1983.** Scanning electron microscopy of infection sites and lesion development on tomato fruit infected with *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Phytopathology*, 73(1) : 39-43.
- Gitaitis R. D., Beaver R. W., Voloudakis, A. E., 1991.** Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptom less tomato transplant. *Plant disease* 75(8): 834-838.
- Gitaitis, R. D., 1990.** Induction of a hypersensitive like reaction in four o'clock by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Dis.* 74: 58–60.
- Gitaitis, R., Walcott, R., 2007.** The epidemiology and management of seed borne bacterial disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45:371-397.
- Glandorf, D. C. M., Brand, I., Bakker, P. A. H. M., Schippers, B. 1992.** Stability of rifampicin resistance as a marker for root colonization studies of *Pseudomonas putida* in the field. *Plant and Soil*, 147(1): 135-142.
- Gleason, M. L., Braun, E. J., Carlton, W. M., Peterson, R. H., 1991.** Survival and Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in Tomatoes. *Phytopathol.* 81 (12):1519-1523.
- Gleason, M. L., Gitaitis, R. D., Ricker, M. D., 1993.** Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. *Plant Dis* 77:1069-1076.
- Glick, B. R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., McConkey, B., 2007.** Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 26(5-6): 227-242.
- Goufo, P., Mofor, C. T., Fontem, D. A., Ngnokam, D., 2008.** High efficacy of extracts of Cameroon plants against tomato late blight disease. *Agronomy for sustainable development* 28 (4) : 567-573.
- Goyal, A., Singh, J., Jain, S., Pathak, D. P. 2009.** Phytochemicals as potential antimutagens. *Int. J. Pharm. Res.* 7: 1-13.
- Gutterson, N. I., Layton, T. J., Ziegler, J. S., Warren, G. J., 1986.** Molecular cloning of genetic determinants for inhibition of fungal growth by a fluorescent pseudomonad. *Journal of bacteriology*, 165(3): 696-703.
- Haas D, Defago G., 2005.** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews in Microbiology* 3(4): 307-19.
- Hadas, R., Kritzman, G., Kleitman, F., Gefen, T., Manulis, S., 2005.** Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathol.* 54:643-649.
- Hagedorn, C., Gould, W. D., Bardinelli, T. R., 1989.** Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. *Applied and environmental microbiology*, 55 (11): 2793-2797.

- Hannig, C., Spitzmuller B., Al-Ahmad, A., Hannig, M., 2008.** Effects of *Cistus-tea* on bacterial colonization and enzyme activities of the in situ pellicle. *J. of dentistry* 36:540–545.
- Hausbeck, M. K., Bell, J., Medina-Mora, C., Podolsky, R., Fulbright, D. W., 2000.** Effect of Bactericides on Population Sizes and Spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Tomatoes in the Greenhouse and on Disease Development and Crop Yield in the Field. *Phytophthol.* 90:38-44.
- Hernández, T., Canales, M., Avila, J. G., García, A. M., Martínez, A., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Lira, R., 2005.** Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf .(Verbenaceae). *J. Ethno. Pharmacol.* 96(3): 551-554.
- Hilario, E., Buckley, T. R., Young, J. M., 2004.** Improved resolution on the phylogenetic relationships among *Pseudomonas* by the combined analysis of atpD, carA, recA and 16S rDNA. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(1) : 51-64.
- Hirt, H., 2012.** Rôle des micro-organismes bénéfiques pour aider les plantes à acquérir une tolérance aux stress environnementaux. *Biologie Aujourd'hui*, 206 (4) : 285-290.
- Höfle, M. G., 1988.** Identification of bacteria by low molecular weight RNA profiles: a new chemotaxonomic approach. *J. Microbiol. Meth.* 8(4): 235-248.
- Hosseini, F., Adlgostar, A., & Sharifnia, F., 2013.** Antibacterial Activity of Pistacia atlantica extracts on Streptococcus mutans biofilm. *International Research Journal of Biological Sciences.* 2 (2): 1-7.
- Howell, C., R., Stipanovic R. D. 1980.** Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotics, Pyoluteorin. *Phytopathology* 70(8): 712-715.
- Howie, W., & Suslow, T., 1986.** Effect of antifungal compound biosynthesis on cotton root colonization and Pythium suppression by a strain of *Pseudomonas fluorescens* and its antifungal minus isogenic mutant. *Phytopathology*, 76, 1069.
- Howie, W., Correll, M., Gutterson, N., & Suslow, T., 1988.** Indirect evidence for oomycin A expression in situ: effect of soil temperature, moisture, and texture. *Phytopathology*, 78, 1558. Abstract.
- Hsouna, A. B., Hamdi, N., 2012.** Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils and organic extracts from pelargonium graveolens growing in Tunisia. *Lipids in health and disease.* 11 (1), 167-173.
- Huang, X., 1992.** A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. *Genomics.* 14 (1): 18-25.
- Huang, Z., Bonsall, R. F., Mavrodi, D. V., Weller, D. M., Thomashow, L. S. 2004.** Transformation of *Pseudomonas fluorescens* with genes for biosynthesis of phenazine-1-carboxylic acid improves biocontrol of rhizoctonia root rot and in situ antibiotic production. *FEMS Microbiol. Ecol.*,49(2) : 243-251.
- Huybens, N., Mainil, J., Marlier, D., 2009..** Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes. *Ann. Méd. Vét.* 153: 112-128.

- Hynes, R. K., Susan M. Boyetchko (2006).** Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 845–849.
- Durak, İ., Biri, H., Avcı, A., Sözen, S., & Devrim, E., 2003.** Tomato juice inhibits adenosine deaminase activity in human prostate tissue from patient with prostate cancer. *Nutrition Research*, 23(9), 1183-1188.
- Imelouane, B., Elbachiri, A., Ankit, M., Benzeid, H., Khedid, K., 2009.** Physico-chemical compositions and antimicrobial activity of essential oil of Eastern Moroccan *Lavandula dentata*. *Int. J. Agric. Biol.* 11: 113-118.
- Isman, M. B., 2000.** Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protection*, 19(8) : 603-608.
- Jahr, H., Bahro, R., Burger, A., Ahlemeyer, J., Eichenlaub, R., 1999.** Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Environmental microbiology*, 1(2): 113-118.
- Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R., Eichenlaub, R., 2000.** The endo- β -1, 4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Molecular plant-microbe interactions*, 13(7), 703-714.
- Jha, B. K., Pragash, M. G., Cletus, J., Raman, G., & Sakthivel, N., 2009.** Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new fluorescent pseudomonad strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida* and *P. mosselii*. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 25(4) : 573-581.
- Jiménez, O., Contreras, N., Nass, H., 2004.** *Xanthomonas albilineas* causal agent of sugarcane (*Saccharum* sp.) leaf scald disease in states Lara and Yaracuy. *Rev Fac Agro* 21:231-241.
- Jones, J. B., Jones, J. P., Statt, R. E., Zetter, T. A., 1991.** Compendium of tomato diseases. Third printing 1997. *APS PRESS*. PP. 73.
- Joseph, B., Dar, M. A., Kumar, V., 2008.** Bioefficacy of plant extracts to control *Fusarium solani* F. sp. *Melongenae* Incitant of Brinjal Wilt. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 3(2) : 56-59.
- Jourdan, E. (2008).** Molecular dialogue between rhizobacteria and vegetal host: two novel elicitors involved in pathogen resistance induction/Dialogue moléculaire entre les rhizobactéries et leur hôte végétal: deux nouveaux éliciteurs impliqués dans l'induction de résistance aux pathogènes. Thèse de doctorat. Université de Liège. pp : 192.
- Kaneshiro, W. S., Mizumoto, C. Y., Alvarez, A. M., 2006.** Differentiation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from seed-borne saprophytes using ELISA, Biolog and 16S rDNA sequencing. *Eur. J. PlantPathol.* 116:45-56.
- Karousou R., Dimitrios N. Koureas, Stella Kokkini, 2005.** Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochemistry* 66: 2668-2673.
- Kasselaki, A. M., Goumas, D., Tamm, L., Fuchs, J., Cooper, J., Leifert, C., 2011.** Effect of alternative strategies for the disinfection of tomato seed infected with bacterial canker

- (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*, 58 (3): 145-147.
- Kaymak, H. C., 2011.** Potential of PGPR in Agricultural Innovations. Plant Growth and Health Promoting Bacteria. *Microbiology Monographs* (18): 45-79.
- Keel, C., Schiuder, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., ... & Défago, G., 1992.** Suppression of Root Diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: Importance of the Bacterial Secondary Metabolite 2, 4-Diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5(1) : 4-13.
- Khan, N. H., Ahsan, M., Yoshizawa, S., Hosoya, S., Yokota, A., Kogure, K., 2008.** Multilocus sequence typing and phylogenetic analyses of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the ocean. *Applied and environmental microbiology*, 74(20): 6194-6205.
- King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E., 1954.** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.
- Kirankumar, R., 2007.** Evaluation of plant growth promoting rhizobacterial strains against tmv on tomato. Master thesis of science (Agriculture) in agricultural microbiology. University of Agricultural Sciences, Dharwad. pp. 98.
- Kirchner, O., 2003.** Etablierung genetischer Methoden für *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und Charakterisierung von Mutanten mit veränderter Morphologie, Physiologie und Virulenz. Thèse de Doctorat Es-sciences. Option microbiologie. Université de Bielefeld, Allemagne. pp. 201.
- Kleitman, F., Barash, I., Burger, A., Iraki, N., Falah, Y., Sessa, G., Manulis-Sasson, S. 2008.** Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. *European Journal of Plant Pathology*, 121(4): 463-475.
- Klement, Z., 1963.** Rapid Detection of the Pathogenicity of Phytopathogenic Pseudomonads. *Nature*, 199 : 299-300.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., & Schroth, M. N., 1980.** *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. *Current microbiology*, 4(5): 317-320.
- Kloepper, J. W., Schorth, M. N., 1981.** Plant growth promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* :642-644
- Kokošková, B., Mráz, I., Fousek, J., 2010.** Comparison of specificity and sensitivity of immunochemical and molecular techniques for determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Folia microbiologica*, 55(3) : 239-244.
- Krämer, I., Griesbach, E. 1995.** Use of ELISA for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 25:185-193.
- Kumar, R. S., Ayyadurai, N., Pandiaraja, P., Reddy, A. V., Venkateswarlu, Y., Prakash, O., Sakthivel, N., 2005.** Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. *Journal of applied microbiology*, 98(1): 145-154.

- Kyselková, M., Moënné-Loccoz, Y., 2012.** *Pseudomonas* and other Microbes in Disease-Suppressive Soils. In *Organic Fertilisation, Soil Quality and Human Health*: 93-140. Springer Netherlands.
- Lamari, L., Sabaou, N., 1993.** Etude comparative de la flore bactérienne de la rhizosphère de deux cultivars de palmier dattier sensible et résistant à la fusariose. *Canadian journal of microbiology*, 39 (9): 874-881.
- Lanteigne, C., Gadkar, V. J., Wallon, T., Novinscak, A., Fillion, M., 2012.** Production of DAPG and HCN by *Pseudomonas* sp. LBUM300 Contributes to the Biological Control of Bacterial Canker of Tomato. *Phytopathology*, 102(10), 967-973.
- Latour, X., Delorme, S., Mirleau, P., Lemanceau, P., 2003.** Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of fluorescent pseudomonads: description of a strategy based on population and model strain studies. *Agronomie* 23:397-405.
- Lee, J., Dossett, M., Finn, C., E., 2012.** *Rubus* fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing. *Food Chemistry*, 130 (4):785-796.
- Levenfors, J., Folkesson Welch, C., Fatehi, J., Wikstrom, M., Rasmussen, S., Hökeberg, M. (2013).** Novel fluorescent pseudomonad of the species *Pseudomonas azotoformans* for enhancement of plant emergence and growth. *U.S. Patent No. 20,130,005,572*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office (Abstract).
- Li, X., Esker, P. D., Pan, Z., Dias, A. P., Xue, L., Yang, X., B., 2010.** The uniqueness of the soybean rust pathosystem: An improved understanding of the risk in different regions of the world. *Plant Disease*, 94(7) : 796-806.
- Ligon, J. M., Hill, D. S., Hammer, P. E., Torkewitz, N. R., Hofmann, D., Kempf, H. J., Pée, K. H. V., 2000.** Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Management Science*, 56(8), 688-695.
- Liu, B., Qiao, H., Huang, L., Buchenauer, H., Han, Q., Kang, Z., Gong, Y. 2009.** Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. *Biological Control*, 49(3), 277-285.
- Liu, L., Kloepper, J. W., Tuzun, S., 1995.** Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology*, 85(10), 1064-1068.
- Loper J. E. 1988.** Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathol.* 78(1): 166-171.
- Loper, J. E., Schroth, M. N., 1986.** Importance of siderophores in microbial interactions in the rhizosphere. In *Iron, Siderophores, and Plant Diseases* (pp. 85-98). Springer US.
- Loper, J. E., Suslow, T. V., & Schroth, M. N. (1984).** Lognormal distribution of bacterial populations in the rhizosphere. *Phytopathology*, 74(12): 1454-1460.
- Lu, Q., Y., Hung, J. C., Heber, D., Go, V., L., Reuter, V., E. , Cordon-Cardo, C., Scher, H., I., Marshall, J., R., Zhang, Z., F., 2001.** Inverse associations between plasma lycopene and other carotenoids and prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 749 – 756.

- Lugtenberg, B. J., de Weger, L. A., Bennett, J. W., 1991.** Microbial stimulation of plant growth and protection from disease. *Current Opinion in Biotechnology*, 2(3) : 457-464.
- Luo, L. X., Walters, C., Bolkan, H., Liu, X. L., Li, J. Q. 2008.** Quantification of viable cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using a DNA binding dye and a real-time PCR assay. *Plant Pathol.* 57:332-337.
- Lynch, J. M., 1990.** Introduction: some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. In: Lynch JM (ed) *The rhizosphere*. Wiley, Chichester, pp 1-10.
- Maheshwari, D. K., Kumar, S., Maheshwari, N. K., Patel, D., Saraf, M., 2012.** Nutrient availability and management in the rhizosphere by microorganisms. In *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management*: 301-326. Springer Berlin Heidelberg.
- Maleki, M., Mokhtarnejad, L., Mostafaei, S., 2011.** Screening of rhizobacteria for biological control of cucumber root and crown rot caused by *Phytophthora drechsleri*. *The Plant Pathology Journal*, 27(1): 78-84.
- Martínez, M. L., von Poser, G., Henriques, A., Gattuso, M., Rossini, C., 2013.** Simaroubaceae and Picramniaceae as potential sources of botanical pesticides. *Industrial Crops and Products* 44: 600-602.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., Provan, G., Chesson, A. 2002.** Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(3): 323-330.
- Medina-Mora, C. M., Hausbeck, M. K., and Fulbright, D. W. 2001.** Bird's eye lesions of tomato fruit produced by aerosol and direct application of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Dis.* 85:88-91.
- Mehnaz, S., Baig, D. N., Jamil, F., Weselowski, B., Lazarovits, G., 2009.** Characterization of a phenazine and hexanoyl homoserine lactone producing *Pseudomonas aurantiaca* strain PB-St2, isolated from sugarcane stem. *J Microbiol Biotechnol*, 19, 1688-1694.
- Meletzus, D., Bèrmpohl, A., Dreier, J., and Eichenlaub, R. 1993.** Evidence for plasmid encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganense* ssp. *michiganense* NCPPB382. *J. Bacteriol.* 175:2131-2136.
- Melzer, M. S., Boland, G. J., 1996.** Transmissible hypovirulence in *Sclerotinia minor*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18(1) : 19-28.
- Menzies, J. G., Jarvis, W. R., 1994.** Bacterial canker. In: Howard RJ, Garland JA, Seaman WL (eds) *Diseases and pests of vegetable crops in Canada*. The Canadian phytopathological society and the entomological society of Canada, Ottawa, pp 341-342.
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Hervás, A., Jiménez-Díaz, R. M., 2004.** Suppression of *Verticillium* wilts in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biol Control* 30:474-486.
- Mew, T. W., Rosales, A. M., 1986.** Bacterisation of rice plants for control of sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 76:1260-1264.

- Meyer, J. M., 2010.** Pyoverdine Siderophores as Taxonomic and Phylogenic Markers In *Pseudomonas* (pp. 201-233). Springer Netherlands.
- Meyer, J. M., Gruffaz, C., Tulkki, T., Izard, D., 2007.** Taxonomic heterogeneity, as shown by siderotyping of strains primarily identified as *Pseudomonas putida*. *Int. J. of Syst. & Evol. Microbiol.* 57(11): 2543-2556.
- Michelsen, C. F., Stougaard, P. (2012).** Hydrogen cyanide synthesis and antifungal activity of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* In5 from Greenland is highly dependent on growth medium. *Canadian journal of microbiology*, 58(4), 381-390.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., e Van Beek, T.A., 2004.** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry*. 85: 231-237.
- Milijasevic, S., Todorovic, B., Potocnik, I., et Stepanovic, M. 2009 (a).** Comparison of different methods in detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Acta Hort.* 808:103-109.
- Milijašević, S., Todorović, B., Potočnik, I., Rekanović, E., & Stepanović, M. 2009 (b).** Effects of copper-based compounds, antibiotics and a plant activator on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouse tomato seedlings. *Pestic. Phytomed.* (Belgrade). 24 (1): 19-27.
- Milus E. A., Rothrock C. S., Rhoads M. L. 1991.** Rhizosphere colonisation by selected soil bacteria and effects on growth and soil borne disease of wheat .*Phytopathology* 81(10) Abst: 1215.
- Milus, E. A., Rothrock, C. S., 1993.** Rhizosphere colonization of wheat by selected soil bacteria over diverse environments. *Canadian journal of microbiology*, 39(3), 335-341.
- Modarresi-Chahardehi, A., Ibrahim, D., Fariza-Sulaiman, S., Mousavi, L., 2012.** Screening antimicrobial activity of various extracts of *Urtica dioica*. *Revista de Biología Tropical*, 60(4), 1567-1576.
- Moënné-Loccoz, Y., Naughton, M., Higgins, P., Powell, J., O'Connor, B., O'Gara, F., 1999.** Effect of inoculum preparation and formulation on survival and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. of Applied Microbiol.* 86(1): 108-116.
- Moënné-Loccoz, Y., Powel, J., Higgins, P., Britton, J., O'gara, F., 1998.** Effect of the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* PF 113 released as sugar beet inoculant on the nutrient of a red clover rotation crop. *Biol. Fertil. Soils*. 27: 380-385.
- Mollet, C., Drancourt, M., Raoult, D., 1997.** rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol. Microbiol.* 26 (5): 1005-1011.
- Montazeri, N., Baher, E., Mirzajani, F., Barami, Z., & Yousefian, S. 2011.** Phytochemical contents and biological activities of *Rosa canina* fruit from Iran. *J. Med. Plant. Res.* 5(18): 4584-4589.
- Moroh, J. L. A., Bahi, C., Dje, K., Loukou, Y. G., Guede-Guina, F., 2008.** Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) *milne-redheat* (rubiceae) sur la croissance in-vitro des souches d'*Escherichia coli*. *Bulletin de la société royale des sciences de Liège*, 77 : 44-61.

- Morrall, R. A. A., Duczek, L. J., & Sheard, J. W., 1972.** Variations and correlations within and between morphology, pathogenicity, and pectolytic enzyme activity in *Sclerotinia* from Saskatchewan. *Canadian Journal of Botany*, 50(4) : 767-786.
- Msanda, F., El Aboudi, A., Peltier, J. P., 2005.** Biodiversité et biogéographie de l'arganeraie marocaine. *Cah. Agric.* 14 : 357-364.
- Mulet, M., Gomila, M., Gruffaz, C., Meyer, J. M., Palleroni, N. J., Lalucat, J., García-Valdés, E., 2008.** Phylogenetic analysis and siderotyping as useful tools in the taxonomy of *Pseudomonas stutzeri*: description of a novel genomovar. *Inter. J. Syst. and Evol. Microbiol.*, 58(10): 2309-2315.
- Mulet, M., Gomila, M., Scotta, C., Sánchez, D., Lalucat, J., García-Valdés, E., 2012.** Concordance between whole-cell matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and multilocus sequence analysis approaches in species discrimination within the genus *Pseudomonas*. *Systematic and applied microbiology*, 35(7): 455-464.
- Mulet, M., Lalucat, J., García-Valdés, E., 2010.** DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1513-1530.
- Nadeem, S. M., Shaharoona, B., Arshad, M., Crowley, D. E., 2012.** Population density and functional diversity of plant growth promoting rhizobacteria associated with avocado trees in saline soils. *Applied Soil Ecology*, 62, 147-154.
- Naik, P. R., Raman, G., Narayanan, K. B., Sakthivel, N. 2008.** Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BMC microbiology*, 8 (1): 230.
- Naz, I., Bano, A., 2010.** Biochemical, molecular characterization and growth promoting effects of phosphate solubilizing *Pseudomonas* sp. isolated from weeds grown in salt range of Pakistan. *Plant and soil*, 334 (1-2): 199-207.
- Nicot, P. C., Blum, B., Köhl, J., Ruocco, M. 2011.** Conclusions and perspectives for future research and development projects on biological control of plant pests and diseases. *Classical and augmentative biological control against diseases and pests: critical status analysis and review of factors*. 45. pp. 68.
- Nielsen, T. H., Christop, C., Anthoni, U., Sorensen, J. 1999.** Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. *Journal of Applied Microbiology* 87:80-90
- Nishimori, E., Kita-Tsukamoto, K., Wakabayashi, H. 2000.** *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Inter. J. Syst. & Evol. Microbiol.* 50 (1): 83-89.
- Nwachukwu, E. O., Umechuruba, C. I., 2001.** Antifungal Activities of Some Leaf Extracts on Seed-borne Fungi of African Yam Bean Seeds, Seed Germination and Seedling Emergence. *J. Appl. Sci. Environ. Mgt.* 5 (1): 29-32
- Olczak-Woltman, H., Schollenberger, M., Niemirowicz-Szczytt, K., 2009.** Genetic background of host-pathogen interaction between *Cucumis sativus* L. and *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. *J. applied genetics*, 50(1): 1-7.

- Olivier, V., Baloché, A., Drouin, A., Audusseau, C., Paillard, S., Soubelet, H. 2010.** Internal methods comparison study and inter-laboratory study on *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 40: 248-256.
- Omar, M. N. A., Osman, M. E. H., Kasim, W. A., El-Daim, I. A., 2009.** Improvement of salt tolerance mechanisms of barley cultivated under salt stress using *Azospirillum brasilense*. In *Salinity and Water Stress*: 133-147. Springer Netherlands.
- Ouattara, K., Doumbia, I., Touré, A., Djaman, A. J., Coulibaly, A. 2013.** Activité antibactérienne des extraits des feuilles de *Morinda morindoides* (*Morinda*, Rubiaceae) sur *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. *Phytothérapie* 11(3):172-177.
- Palleroni, N. J., 2005.** Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, Vol. 2. *The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria*. Brenner, D.J., Krieg, N.R., and Staley, J.T. (eds). New York, USA: Springer, pp. 323–379.
- Palleroni, N. J., 2010.** The *Pseudomonas* story. *Envir. Microbiol.* 12 (6): 1377-1383.
- Panizzi, L., Caponi, C., Catalano, S., Cioni, P. L., Morelli, I., 2002.** *In vitro* antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *J Ethnopharmacol.* 79 (2):165-168.
- Park, I. K., Kim, J., Lee, Y. S., Shin, S. C., 2008.** *In vivo* fungicidal activity of medicinal plant extracts against six phytopathogenic fungi. *Inter. J. of pest management* 54 (1): 63-68.
- Park, Y. D., Lee, H. B., Yi, H., Kim, Y., Bae, K. S., Choi, J. E., Chun, J. 2005.** *Pseudomonas panacis* sp. nov., isolated from the surface of rusty roots of Korean ginseng. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(4): 1721-1724.
- Parke, J. L., Moen, R., Rovira, A. D., Bowen, G. D., 1986.** Soil water flow affects the rhizosphere distribution of a seed-borne biological control agent, *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol Biochem.* 18:583–588.
- Pastor, N. A., Reynoso, M. M., Tonelli, M. L., Masciarelli, O., Rosas, S. B., Rovera, M., 2010.** Potential biological control *Pseudomonas* sp. PCI2 against damping-off of tomato caused by *Sclerotium rolfsii*. *J. of Plant Pathol.* 92(3): 737-745.
- Pastor, N., Carlier, E., Andrés, J., Rosas, S. B., Rovera, M., 2012.** Characterization of rhizosphere bacteria for control of phytopathogenic fungi of tomato. *Journal of Environmental Management*, 95, S332-S337.
- Pastrik, K. H., and Rainey, F. A. 1999.** Identification of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. *J. Phytopathol.* 147: 687-693.
- Patel, D., Jha, C. K., Tank, N., Saraf, M., 2012.** Growth enhancement of chickpea in saline soils using plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31(1), 53-62.

- Paul, D., Nair, S. (2008).** Stress adaptations in a plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) with increasing salinity in the coastal agricultural soils. *Journal of basic microbiology*, 48(5): 378-384.
- Paulitz, T., Nowak-Thompson, B., Gamard, P., Tsang, E., Loper, J., 2000.** A novel antifungal furanone from *Pseudomonas aureofaciens*, a biocontrol agent of fungal plant pathogens. *Journal of chemical ecology*, 26(6) : 1515-1524.
- Peix, A., Rivas, R., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Rodríguez-Barrueco, C., & Velázquez, E., 2003.** *Pseudomonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate in vitro. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(6), 2067-2072.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., 2009.** Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. & Evol.* 9(6): 1132-1147.
- Perneel, M., Heyrman, J., Adiobo, A., De Maeyer, K., Raaijmakers, J. M., De Vos, P., Höfte, M. 2007.** Characterization of CMR5c and CMR12a, novel fluorescent *Pseudomonas* strains from the cocoyam rhizosphere with biocontrol activity. *Journal of applied microbiology*, 103(4): 1007-1020.
- Pierson E. A., Weller D. M. 1994.** Use of mixture of *fluorescent pseudomonads* to suppress take-all and improve the growth of wheat. *Phytopathology* 84(9): 940-947.
- Pierson, L. S., Thomashow, L. S., 1992.** Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthesis locus from *Pseudomonas aureofaciens*. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 5: 330-339
- Pouvova, D., Kokoskova, B., Pavela, R., Rysanek, P., (2008).** Effectivity of plant essential oils against *Clavibacter michiganensis*, *in vitro*. *Zemdirbyste-Agriculture*. 95(3): 440-446.
- Purseglove, J. W., 1982.** Tropical crops: dicotyledons. Logman Group. Ltd. Essex. CM20. 2JE. England: 523-537.
- Raaijmakers, J. M., Leeman, M., Van Oorschot, M. M., Van der Sluis, I., Schippers, B., Bakker, P. A. H. M., 1995.** Dose-response relationships in biological control of Fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 85(10) : 1075-1081.
- Raaijmakers, J. M., Mazzola, M., 2012.** Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual review of phytopathology*, 50: 403-424.
- Raaijmakers, J. M., Weller, D. M., 2001.** Exploiting Genotypic Diversity of 2, 4-Diacetylphloroglucinol-Producing *Pseudomonas* spp.: Characterization of Superior Root-Colonizing *P. fluorescens* Strain Q8r1-96. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6): 2545-2554.
- Raio, A., Puopolo, G., Cimmino, A., Danti, R., Della Rocca, G., Evidente, A., 2011.** Biocontrol of cypress canker by the phenazine producer *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *Aureofaciens* strain M71. *Biological Control*, 58 (2): 133-138.

- Ramanujam, J. R., & Kulothungan, S. 2011.** A Novel Approach to Intrude Secondary Metabolites of *Pseudomonas Fluorescens* as a Biocontrol Substance Against *Alternaria Alternata* (September 3, 2012). *The IUP Journal of Biotechnology*, 5(4): 20-27.
- Ramesh, R., Joshi, A. A., Ghanekar, M. P., (2009.** *Pseudomonads*: major antagonistic endophytic bacteria to suppress bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum* in the eggplant (*Solanum melongena* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(1) : 47-55.
- Ramette, A., Frapolli, M., Saux, M. F. L., Gruffaz, C., Meyer, J. M., Défago, G., Moënné-Loccoz, Y., 2011.** *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2, 4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Systematic and applied microbiology*, 34 (3): 180-188.
- Rangel-Castro, J. I., Levenfors, J. J., & Danell, E., 2002.** Physiological and genetic characterization of fluorescent *Pseudomonas* associated with *Cantharellus cibarius*. *Canadian journal of microbiology*, 48(8): 739-748.
- Raupach, G. S., & Kloepper, J. W. (1998).** Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, 88(11):1158-1164.
- Ravikumar, M. C., Garampalli, R. H., 2013.** Antifungal activity of plants extracts against *Alternaria solani*, the causal agent of early blight of tomato. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, (en presse), 1-7.
- Rawat, S., Jugran, A., Giri, L., Bhatt, I. D., Rawal, R. S., 2011.** Assessment of Antioxidant Properties in Fruits of *Myrica esculenta*: A Popular Wild Edible Species in Indian Himalayan Region. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2011 : 512787-512787.
- Reller, L. B., Weinstein, M. P., Petti, C. A., 2007.** Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical infectious diseases*, 44 (8): 1108-1114.
- Rosas, S. B., Avanzini, G., Carlier, E., Pasluosta, C., Pastor, N., Rovera, M., 2009.** Root colonization and growth promotion of wheat and maize by *Pseudomonas aurantiaca* SR1. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(9): 1802-1806.
- Rosas, S. B., Pastor, N. A., Guiñazú, L. B., Andrés, J. A., Carlier, E., Vogt, V., Rovera, M., 2011.** Efficacy of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* SR1 for Improving Productivity of Several Crops. *Crop Production Technologies*, 978953307787-1, InTech, 199-210.
- Roy, B., Sarker, B. C., Ali, M. R., Das, S. R., Sayed, M. A. S., 2012.** Seed Germination and Seedling Growth of Two Vegetables in Response to Aqueous Extract of Four Herbal Plant Leaves. *J. Environ. Sci. & Natural Resources*, 5(1): 141-150, ISSN 1999-7361.
- Sajben, E., Manczinger, L., Nagy, A., Kredics, L., Vágvolgyi, C., 2011.** Characterization of pseudomonads isolated from decaying sporocarps of oyster mushroom. *Microbiol. Res.* 166 (4): 255-267.

- Santos, M. S., Cruz, L., Norskov, P., and Rasmussen, O. F. 1997.** A rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by polymerase chain reaction. *Seed Sci. Technol.* 25:581-584.
- Sarah, S. N., Sijam K., Omar D., 2012.** Antibacterial activity of psidium guajava L. methanol leaf extract against plant pathogenic bacteria in the genera *Pectobacterium* and *Xanthomonas*. *Int. J. Appl. Biol. Pharmac. Technol.* 3: 246-252.
- Satrani, B., El Ouadihi, N., Guedira, A., Frey-Klett, P., Arahou, M., Garbaye, J., 2009.** Effet de la bactérisation des graines sur la croissance des plants de Cedrus atlantica Manetti. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13 (3) : 367-372.
- Schaad, N. W. 1988.** Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd edition. APS. St. Paul, MN. 164 pp.
- Schaad, U. B., Salam, M. A., Aujard, Y., Dagan, R., Green, S. D., Peltola, H., Adam, D., 1995.** Use of fluoroquinolones in pediatrics: consensus report of an International Society of Chemotherapy commission. *The Pediatric infectious disease journal*, 14(1): 1-9.
- Schorth, M. N., Hancock, J. G., 1982.** Selected topics in biological control. *Annu Rev. Microbiol.* 35:453–476.
- Selvakumar, G., Joshi, P., Nazim, S., Mishra, P. K., Bisht, J. K., & Gupta, H. S., 2009.** Phosphate solubilization and growth promotion by *Pseudomonas fragi* CS11RH1 (MTCC 8984), a psychrotolerant bacterium isolated from a high altitude Himalayan rhizosphere. *Biologia*, 64(2) : 239-245.
- Selvakumar, G., Joshi, P., Suyal, P., Mishra, P. K., Joshi, G. K., Bisht, J. K., Gupta, H. S., 2011.** *Pseudomonas lurida* M2RH3 (MTCC 9245), a psychrotolerant bacterium from the Uttarakhand Himalayas, solubilizes phosphate and promotes wheat seedling growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 1129-1135.
- Shah-Smith, D. A., Burns, R. G., 1996.** Biological control of damping-off of sugar beet by *Pseudomonas putida* applied to seed pellets. *Plant pathol.* 45(3): 582-00.
- Shah-Smith, D. A., Burns, R. G., 1997.** Shelf-life of a biocontrol *Pseudomonas putida* applied to sugar beet seeds using commercial coatings. *Biocontrol Science and Technol.* 7(1) : 65-74.
- Shankara N., De Jeude J. V. L., De Goffau M., Hilmi M., Van Dam B. 2005.** Cultivation of tomato: production, processing and marketing. Wageningen, The Netherlands: Agromisa Foundation, pp. 92.
- Siddiqui, S., Siddiqui, Z. A., Ahmad, I., 2005.** Evaluation of fluorescent *Pseudomonads* and *Bacillus* isolates for the biocontrol of a wilt disease complex of *Pigeonpea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5): 729-732.
- Singh, N., Jain, N. K., Kannoja, P., Garud, N., Pathak, A. K., Mehta, S. C., 2010.** In vitro antioxidant activity of *Calotropis gigantea* hydroalcoholic leaves extract. *Der Pharmacia Lettre*, 2(3) : 95-100.

- Sisti, M., De Santi, M., Fraternale, D., Ninfali, P., Scoccianti, V., Brandi, G., 2008.** Antifungal activity of *Rubus ulmifolius* Schott standardized in vitro culture. *LWT Food Sci. Technol.* 41: 946-950.
- Ślusarski, C., 2004.** Evaluation of chemical and biological control methods for their potential to reduce bacterial canker of tomato in a greenhouse stonewool cultivation system. In *VI International Symposium on Chemical and non-Chemical Soil and Substrate Disinfestation-SD2004* 698 (pp. 299-304).
- Someya, N., Morohoshi, T., Ikeda, T., Tsuchiya, K., Ikeda, S. 2012.** Genetic Diversity and Ecological Evaluation of Fluorescent Pseudomonads Isolated from the Leaves and Roots of Potato Plants. *Microbes and Environments*, 27(2), 122-126.
- Stackebrandt, E., Goebel, B. M., 1994.** Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846–849.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kämpfer, P., Maiden, M. C., ... & Whitman, W. B. (2002).** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Inter. J. Syst. & Evol. Microbiol.* 52 (3): 1043-1047.
- Standing, D., Banerjee, S., Rangel-Castro, J. I., Jaspars, M., Prosser, J. I., Killham, K., 2008.** Novel Screen for Investigating In Situ Rhizosphere Production of the Antibiotic 2, 4-Diacetylphloroglucinol by Bacterial Inocula. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 39 (11-12): 1720-1732.
- Strider, D. L., 1967.** Survival studies with tomato bacterial canker of organism. *Phytopathol.* 57:1067-1071.
- Strider, D. L., 1969.** Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganensis*. A literature review and bibliography. North Carolina Agricultural Experiment Station. *Tech. Bull.* No. 193. pp.110.
- Surveswaran, S., Cai, Y. Z., Corke, H., Sun, M., 2007.** Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 102(3) : 938-953.
- Surveswaran, S, Cai, YZ, Xing, J, Corke, H, Sun, M., 2010.** Antioxidant properties and principal phenolic phytochemicals of Indian medicinal plants from Asclepiadoideae and Periplocoideae. *Natural Product Research*, 24 (3): 206-221.
- Suslow, T. V., 1982.** Role of Root-colonizing bacteria in plant growth. Phytopathogenic prokaryotes (1). M.S. Mount and G. Lacy, eds. Academic press, New york: 187-223.
- Suslow, T. V., Schorth, M. N. Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogenin reducing crop growth.** *Phytopathol.* 72: 111-115.
- Susse T. 1998.** Etude de la colonisation de la rhizosphère du maïs par une souche de *Pseudomonas fluorescens* en sol non stérile. Sélection d'un mutant résistant à la Rifampicine. Détection et quantification. DEA INPL, Nancy. pp.36.

- Sutra, L., Risède, J. M., Gardan, L., 2000.** Isolation of fluorescent pseudomonads from the rhizosphere of banana plants antagonistic towards root necrosing fungi. *Lett Appl Microbiol* 31 (4): 289–293.
- Tahrouch, S., 1992.** Les esters heterosidiques de l'acide caféique chez le genre *Jasminum* (Tourn.) L. en culture in vitro : identification et bioaccumulation. Thèse de Doctorat de l'Université de Montpellier II. Spécialité : physiologie, biologie des organismes et populations. pp. 189.
- Talibi, I., Amkraz, N., Askarne, L., Msanda, F., Saadi, B., Boudyach, E. H., Ait Ben Aoumar, A., 2011.** Antibacterial activity of Moroccan plants extracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomatoes' bacterial canker. *J Med Plants Res.* 5: 4332-4338.
- Talibi, I., Askarne, L., Boubaker, H., Boudyach, E. H., Msanda, F., Saadi, B., & Ait Ben Aoumar, A., 2012 (a).** Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causal agent of postharvest citrus sour rot. *Crop Protection.* 35:41-46.
- Talibi, I., Askarne, L., Boubaker, H., Boudyach, E. H., Msanda, F., Saadi, B., & Ait Ben Aoumar, A., 2012 (b).** Antifungal activity of Moroccan medicinal plants against citrus sour rot agent *Geotrichum candidum*. *Letters in applied microbiology.* 55(2): 155-161.
- Taqarort, N., Echairi, A., Chaussod, R., Nouaim, R., Boubaker, H., Ait Ben Aoumar, A., Boudyach, E. H., 2008.** Screening and identification of epiphytic yeasts with potential for biological control of green mold of citrus fruits. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24:3031-3038.
- Teixeira, G., Correia, A.I., Vasconcelos, T., Duarte, A., Oliveira, N., Madureira A.M., 2012.** *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* and *L. pedunculata*: comparative antibacterial activity. *Journal of Phytotherapy and Pharmacology.* 1 (4): 11-15.
- Thiem, B., Goślińska, O., 2004.** Antimicrobial activity of *Rubus chamaemorus* leaves. *Fitoterapia.* 75: 93–95.
- Thomashow L. S., Weller D. M. 1988.** Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Journal of microbiology* 170(8): 3499-3508.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J., 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids Res.* 22 (22): 4673-4680.
- Thyr, B. D., Samuel, M. J., Brown, P. G., 1975.** New solanaceous host records for *Corynebacterium michiganense*. *Plant Disease Reporter.* 59: 595-598.
- Tobias, A., Lehocski-Tornai, J., Szalai, Z., Csambalik, L., Radics, L., 2007.** Effect of different treatments to bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*) in tomato, and bacterial spot (*Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*) in pepper. *Inter. J. of Horti. Sc.* 13 (2): 49-53.

- Tomás-Menor, L., Morales-Soto, A., Barraji n-Catal n, E., Rold n-Segura, C., Segura-Carretero, A., & Micol, V., 2013.** Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species. *Food and Chemical Toxicology*. 55: 313-322.
- Tripathi, J., Tiwari, P., Ekka, S. R., 2011.** In Vitro Study of *Pseudomonas* spp. Isolated from Soil. *Journal of Phytology*, 3(4): 21-22.
- Trivedi, P., Pandey, A., Palni, L. M. S., 2008.** In vitro evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugates*. *Microbiol Res*. 163: 329–336.
- Troxler, J., Svercel, M., Natsch, A., Zala, M., Keel, C., Mo  ne-Loccoz, Y., Défago, G., 2012.** Persistence of a biocontrol *Pseudomonas* inoculant as high populations of culturable and non-culturable cells in 200-cm-deep soil profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 44(1): 122-129.
- Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L. U. I. G. I., De Palma, M. O. N. I. C. A., Lorito, M., 2011.** The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular plant pathology*, 12 (4): 341-354.
- Tzortzakis, N. G., Economakis, C. D., 2007.** Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innov. Food Sc. Emerging Technol.* 8(2): 253-258.
- Umesha, S., 2006.** Occurrence of bacterial canker in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. *Crop Protection*. 25: 375-381.
- Utkhede, R., Koch, C., 2004.** Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. *BioControl*. 49: 305-313.
- Uzair, B., Ahmed, N., Mohammad, F. V., Ahmad, V. U. 2008.** Detection, isolation and partial characterization of antifungal compound (s) Produced by *Pseudomonas aeruginosa* CMG1055. *Journal of the chemical society of Pakistan*, 30(4): 649-653.
- Validov, S. (2007).** *Biocontrol of tomato foot and root rot by Pseudomonas bacteria in stonewool*. Thèse de Doctorat. Department of Molecular Microbiology, Institute of Biology, Faculty of Science, Leiden University. pp. 192.
- Validov, S., Mavrodi, O., La Fuente, L., Boronin, A., Weller, D., Thomashow, L., Mavrodi, D., 2005.** Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS microbiology letters*, 242 (2): 249-256.
- Validov, S., Kamilova, F., Qi, S., Stephan, D., Wang, J. J., Makarova, N., & Lugtenberg, B., 2007.** Selection of bacteria able to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in stonewool substrate. *Journal of applied microbiology*, 102(2), 461-471.
- Validov, S. Z., Kamilova, F., Lugtenberg, B. J., 2009.** *Pseudomonas putida* strain PCL1760 controls tomato foot and root rot in stonewool under industrial conditions in a certified greenhouse. *Biological Control*, 48(1): 6-11.
- Vancanneyt, M., Segers, P., Torck, U., Hoste, B., Bernardet, J. F., Vandamme, P., Kersters, K., 1996.** Reclassification of *Flavobacterium odoratum* (Stutzer 1929) Strains

- to a New Genus, *Myroides*, as *Myroides odoratus* comb. nov. and *Myroides odoratimimus* sp. nov. *Inter. J. Sys. Bacteriol.* 46 (4): 926-932.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., & Swings, J., 1996.** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews*, 60(2): 407-438.
- Van peer R., Niemann C. J. and Schippers B. 1991.** Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* Sp. Strain WCS417r. *Phytopathology* 81: 728-734.
- Vargas, L. K., Lisboa, B. B., Giongo, A., Beneduzi, A., Passaglia, L. M. P., 2010.** Potential of Rhizobia as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. In *Microbes for Legume Improvement* (pp. 137-155). Springer Vienna.
- Veena, M. S., Van Vuurde, J. W. L. 2002.** Indirect immunofluorescence colony staining method for detecting bacterial pathogens of tomato. *J. Microbiol. Methods* 49:11-17.
- Verma, R., Naosekham, A. S., Kumar, S., Prasad, R., Shanmugam, V., 2007.** Influence of soil reaction on diversity and antifungal activity of fluorescent pseudomonads in crop rhizospheres. *Bioresour Technol.* 98:1346-1352.
- Vessey, J. K. (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2): 571-586.
- Vidaver, A. K., 1967.** Synthetic and complex media for rapid detection of fluorescence of phytopathogenic *Pseudomonas*: effect of carbon source. *Appl Microbiol.* 15:1523-1524.
- Villeneuve, C., 2004.** Le chancre bactérien de la tomate. *Agri-Vision, France.* pp 4.
- Vincent, M. N., Harrison, L. A., Brackin, J. M., Kovacevich, P. A., Mukerji, P., Weller, D. M., Pierson, E. A., 1991.** Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(10) : 2928-2934.
- Vlassak, K., Van Holm, L., Duchateau, L., Vanderleyden, J., De Mot, R., 1992.** Isolation and characterization of fluorescent *Pseudomonas* associated with the roots of rice and banana grown in Sri Lanka. *Plant and Soil*, 145(1), 51-63.
- von Felten, A., Meyer, J. B., Défago, G., Maurhofer, M., 2011.** Novel T-RFLP method to investigate six main groups of 2,4-diacetylphloroglucinol producing pseudomonads in environmental samples. *J. Microbiol. Meth.*, 84(3) : 379-387.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996).** *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas.* Springer Verlag.
- Wang, X. Y., Xu, Y. Q., Lin, S. J., Liu, Z. Z., Zhong, J. J. (2011).** Novel Antiphytopathogenic Compound 2-Heptyl-5-Hexylfuran-3-Carboxylic Acid, Produced by Newly Isolated *Pseudomonas* sp. Strain SJT25. *Applied and environmental microbiology*, 77(17), 6253-6257.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., ... & Truper, H. G., 1987.** Report of the ad hoc committee on

- reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(4), 463-464.
- Wei, G., Kloepper, J. W., Tuzun, S., 1991.** Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 81(11), 1508-1512.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J., 1991.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2): 697-703.
- Weller D. M., howie W. J. Cook R.J. 1988.** Relationship between in vitro inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and suppression of take-all of wheat by *Fluorescent Pseudomonads*. *Phytopathology* 78(8): 1094-1100.
- Weller, D. M., 1988.** Biological control of soil borne pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann Rev Phytopathol.* 26:379–407.
- Weller, D. M., Cook, R. J., 1983.** Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, 73(3), 463-469.
- Whipps, J.M., Lumsden, R.D., (2001).** Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol agents. Progress, Problems and Potential*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 9-22.
- Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dineen, S. S., Ralyea, R., Boor, K. J., 2000.** Molecular and Phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5): 2085-2095.
- Wilson, E. E., Zeitoun, F. M., Fredrickson, D. L., 1967.** Bacterial phloem canker, a new disease of Persiam Walnut tree. *Phytopathology* 57: 618-621.
- Wruck, D. S. M., Oliveira, J. R., & Romeiro, R. D. S., 2006.** Control of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in bamboo stakes used for tomato production. *Summa Phytopathologica*, 32(4): 373-375.
- Wu, C., Chang, H., Hsui, Y., Hsu, Y., Liu, J., Wang, S., Chang, S., 2013.** Antioxidant-enriched leaf water extracts of *Cinnamomum osmophloeum* from eleven provenances and their bioactive flavonoid glycosides. *BioResources* 8 (1): 571-580.
- Xu, G. W., Gross, D. C., 1986.** Field evaluation of the interaction among fluorescent *Pseudomonas*, *Erwinia carotova* and potato yields. *Phytopathology*. 76:423–430.
- Xu, X., 2010.** Seed Transmission of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and development of strategies to control the pathogen in seed. Doctoral dissertation, Ohio State University. pp. 164.
- Xu, X., Miller, S. A., Baysal-Gurel, F., Gartemann, K. H., Eichenlaub, R., & Rajashekara, G., 2010.** Bioluminescence imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection of tomato seeds and plants. *Applied and environmental microbiology*, 76(12) : 3978-3988.
- Yuen Y., Schroth M. N., McCain A. H., 1985.** Reduction of *Fusarium* wilt of carnation with suppressive soils and antagonistic bacteria. *Plant disease* 69(12): 1071-1075.

- Zaluga, J., Stragier, P., Van Vaerenbergh, J., Maes, M., De Vos, P., 2013.** Multilocus Variable-Number-Tandem-Repeats Analysis (MLVA) distinguishes a clonal complex of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains isolated from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Belgium. *BMC microbiology*, 13(1). Abstract.
- Zare, M., Ordoorkhani, K., Alizadeh, O., 2011.** Effects of PGPR and AMF on Growth of Two Bred Cultivars of Tomato. *Advances in Environmental Biol.* 5 (8): 2177-2181.
- Zarins, I., Daugavietis, M., Halimona, J., 2009.** Biological activity of plant extracts and their application as ecologically harmless biopesticide. Scientific works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture. 28(3): 269-280.
- Zhao, W. J., Chen, H. Y., Zhu, S. F., Xia, M. X., and Tan, T. W. 2007.** One-step detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato seeds using a TaqMan probe. *J. Plant Pathol.* 89:349-351.
- Zhou, T., Chen, D., Li, C., Sun, Q., Li, L., Liu, F., Shen, B., 2012.** Isolation and characterization of *Pseudomonas brassicacearum* J12 as an antagonist against *Ralstonia solanacearum* and identification of its antimicrobial components. *Microbiological Research*, 167 (7), 388-394.
- Zrira, S. (2006).** Aromatic Productions of Morocco. *J. Essential Oil Bearing Plants*, 9(2): 204-210.

Annexes

Annexe1 :milieux de culture et tampons

Milieu de King B (KB)

Protéase peptone.....	2g
K ₂ HPO ₄	1,5g
MgSO ₄	1,5g
Glycérol.....	10g
Agar.....	15g
H ₂ O distillée qsp.....	1000ml

Milieu de King B⁺ (KB⁺)

Après autoclavage du milieu KB, on y ajoute les antibiotique suivants préalablement filtrés à

0,2um :	-Cycloheximide.....100µg/ml
	-Ampiciline.....100µg/ml
	-Chloramphénicol...30µg/ml
	-Rifampicine.....100µg/ml

Milieu NBY(Nutrient Broth Yeast extract agar)

Extrait de levure.....	2g
Bouillant nutritif.....	8g
KH ₂ PO ₄	0,5g
MgSO ₄	0,25g
K ₂ HPO ₄	2g
Glucose.....	5g
Agar.....	15
H ₂ O distillée qsp.....	1000ml

Milieu YDC (Yeast Dextrose Carbonate Agar)

Extrait de levure.....	10g
Glucose.....	20g
Carbonate de Calcium.....	20g
Agar.....	15g
Eau distillée qsp.....	1000ml

Milieu SCM

MgSO ₄	0,25g
K ₂ HPO ₄	2g
KH ₂ PO ₄	0,5g
Acide borique.....	1,5g
Saccharose.....	10g
Extrait de levure.....	0,1g
Agar.....	15g
H ₂ O distillée qsp.....	1000ml

Après autoclavage (120°C pendant 20mn), on ajoute les produits suivants stérilisés par filtration à 0,2µm :

- ♦ Le cycloheximide (200µg/ml)
- ♦ Acide nalidixique (30µg/ml)
- ♦ Acide nicotinique (100µg/ml)
- ♦ Tellurite de K (7,5µg/ml)

Milieu LG

Extrait de levure.....	5g
Glucose.....	10g
H ₂ O distillée qsp.....	1000ml

Milieu TSA

TSA (Difco).....	4g
Agar	12g
H ₂ O distillée qsp.....	1000ml

EAU PHYSIOLOGIQUE

NaCl.....	8,5g
H ₂ O distillée qsp.....	1000ml

Tampon phosphate 0.05M (pH 6.5)

KH ₂ PO ₄	70ml
K ₂ HPO ₄	30ml
Eau distillée.....	300ml

Annexe 2 : Les séquences du gène de l'ARNr 16S des **Pseudomonas fluorescents antagonistes**

RN39e_ARNr16S

GGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACG
 TTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCT
 TCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA
 TGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTG
 GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC
 AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATT
 GTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGA
 CGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACA
 GAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTT
 GTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAACTGA
 CTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGT
 AGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTAATACTGACA
 CTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
 CCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAAGCCTTGAGCTTTTAGTGGCGCAGCTA
 ACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGA
 ATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC
 GAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCTAGAGATAGATTGGTGC
 CTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA
 TGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTA
 ATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG
 ACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCG
 GTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTA
 GTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC
 GAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAC
 ACCATG

RN42b_ARNr16S

CGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTT
TCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTC
GGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATG
GCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGG
AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA
ATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTG
TAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGTTTTGAC
GTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACA
GAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTC
GTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGG
CGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACA
CTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTA
ACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGA
ATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC
GAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGC
CTTCGGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA
TGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTT
ATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCG
GTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTA
GTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC
GAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCAC
ACCATGGGA

RN47_e_ARNr16S

GCTTGCTTCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGC
CTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACTGCTACG
GGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGAT
TAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAG
AGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGT
GTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTTGTAG

ATTAATACTCTGCAATTTTACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCG
TAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCT
GGGAAGTGCATTCAAACTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAATTC
CTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGA
CCACCTGGACTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAAGCCTT
GAGCTTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCG
CAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT
GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACT
TTCTAGAGATAGATTGGTGCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGT
CGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTG
TCCTTAGTTACCAGCACGTCATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAA
CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTA
CACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTA
ATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAG
TCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC
TTGTACACACCGCCCGTCACACCA

RN53 b_ARNr16S

CCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAA
TACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAG
ATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACG
ATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGAT
CCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTG
GGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAG
CACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTAAAGTTGGATGTGAAAG
CCCCGGGCTCAACCTGGGAACAGTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTACGGT
AGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCA
ACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGAC

CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCG
 CACAAGCGGTAGGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC
 AGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCT
 GACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGT
 CCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTC
 TAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATC
 ATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGGGTTG
 CCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAG
 TCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTC
 GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGCT

RN58_ARNr16S

GCTTGCTTCTCTTGAGAGCTCCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCC
 TGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACG
 GGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGAT
 TAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAG
 AGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCA
 GCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGT
 GTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTTGTAG
 ATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGT
 GCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCG
 TAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCT
 GGGAAGTGCATTCAAACTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTC
 CTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGA
 CCACCTGGACTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT
 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAAGCCTT
 GAGCTTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCG
 CAAGGTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGT
 GGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACT
 TTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGT
 CGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTG
 TCCTTAGTTACCAGCACGTCATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAA
 CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTA
 CACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTA

ATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAG
TCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC
TTGTACACACCGCCCGTCACACCAGC

RN63_ARNr16S

GACAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGG
AATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAAC
GTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTA
GGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCT
GGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATG
CCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGG
GTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTA
ACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAC
TGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCT
CAACCTGGGAACTGCATTCAAACTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTG
GAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCG
AAGGCGACCACCTGGACTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGG
AAGCCTTGAGCTTTTAGTGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGT
ACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGG
AGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCA
ATGAACTTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCA
TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCA
ACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTCATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGG
TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCC
TGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGT
GGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTG
CGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTT
CCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGA

RN69_ARNr16S

GCTCCTTGATTCCCCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGT
 AGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGCCTACGGGAG
 AAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCTGGATTAGCT
 AGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGA
 TGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 TGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGA
 AGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTA
 ATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCA
 GCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
 GCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGA
 ACTGCATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGT
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCAC
 CTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
 TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGA
 TTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
 GTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
 TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCC
 AGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC
 AGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCT
 TAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGG
 AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACA
 CGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTC
 ACAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGA
 ATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTGCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
 CACACCGCCCGTCACACCATG

RN130_ARNr16S

GACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTC
 GAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGG
 GCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGC
 TCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAA
 CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAT
 GGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTA
 AAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGTTTTGACGT

TACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGA
GGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTT
AAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCG
AGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACAC
TGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
CGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAA
CGCATTAAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAA
TTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG
AAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCC
TTCGGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGAT
GTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTA
TGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGG
TACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAG
TCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCG
AATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACA
CCATG

Annexe 3 : Les séquences du gène rpoB des Pseudomonas fluorescents antagonistes

RN 39e_rpoB

TAGTTCATGGGGACAGAACAACCCGCTCTCCGAGATCACCCACAAGCGCC
GTGTTTCTGCACTGGGCCCCGGGCGGTCTGACCCGTGAGCGTGCTGGCTTTGAAG
TCCGTGACGTACACCCGACGCATTACGGTCGTGTATGCCCGATCGAAACGCCGG
AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGGCTGCCTATGCGCGCACCAACC
AGTACGGCTTCCTCGAAAGCCCATAACCGTGTGGTGAAAGACGCCCTGGTCACCG
ACGAGATCGTATTCTGTCCGCCATCGAAGAAGCTGATCACGTGATCGCTCAGG
CTTCGGCCACGATGAACGACAAGAAAGTCCTGGTCGACGAGCTGGTAGCTGTCC
GTCAC TTGAACGAATTACCCCGTGAAGGA

RN42b_rpoB

TAAGTTCAAGGGGGCAGAACAACCCGCTCTCCGAGATCACCCACAAGCGC
CGCGTCTCCGCACTCGGCCCTGGCGGTCTGACCCGTGAGCGTGCCGGCTTCGAA
GTCCGTGACGTACACCCGACCCACTACGGCCGTGTGTGCCCGATCGAGACCCCT
GAAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGGCAGCCTATGCCCGCACCAAC
CAGTACGGCTTCCTGGAAAGCCCGTACCGCGTGGTGAAGGAAGGCGTGGTCAG
CGACGACATCGTGTTCTGTCCGCCATTGAAGAAGCGGATCATGTCATCGCCCA
GGCTTCGGCCGCGATGAACGAGAAGAAGCAACTGATCGATGAGCTGAGTAGCT
GTTCGTACCTGAACGAATTACCCGTGAAGGA

RN47e_rpoB

TAGTTCATGGGGGCCAGAACAACCCGCTCTCCGAGATCTAATCCACAAGC
GCCGTGTTTCTGCACTGGGCCCCGGGCGGTCTGACCCGTGAGCGTGCTGGCTTTG
AGGTTCGTGACGTACACCCGACGCACTACGGTCGTGTTTGCCCGATCGAAACGC
CGGAAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGGCCGCTTATGCGCGCACCA
ACCAGTACGGCTTCCTCGAGAGCCCGTACCGTGTGGTGAAAGACGCTCTGGTCA
CCGACGAGATCGTGTTCTGTCCGCCATCGAAGAAGCTGATCACGTGATCGCTC
AGGCCTCGGCCACGATGAACGACAAGAAAGTCCTGATCGACGAGCTGAGGTAG
CTGTTCGTCACTTGAACGAATTACCCGTGAAGGA

RN53b_rpoB

TAGTTCATGGGGGACAGAACAACCTGCTCTCCGAGATCACCCACTAATGA
CAGCGCGCGTCTCCGCACTCGGCCCTGGCGGTCTGACCCGTGAGCGTGCCGGCT
TCGAAGTCCGTGACGTACACCCGACCCACTACGGCCGTGTGTGCCCGATCGAGA
CCCCTGAAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGGCAGCCTATGCCCGCA
CCAACCAGTACGGCTTCCTGGAAAGCCCGTACCGCGTGGTGAAGGAAGGCGTG
GTCAGCGACGACATCGTGTTCTGTGCGCCATTGAAGAAGCGGATCATGTCATC
GCCCAGGCTTCGGCCGCGATGAACGAGAAGAAGCAACTGATCGATGAGCTGAG
TACCTGTTCGTCACCTGAACGAATTACCCCGTGAAGGA

RN58_rpoB

TAGTTCATGGGGCCAGAACAACCCGCTCTCCGAGATCACCCACAAGCGCC
GTGTTTCTGCACTGGGCCCCGGGCGGTCTGACCCGTGAGCGTGCTGGCTTTGAGG
TTCGTGACGTACACCCGACGCACTACGGTCGTGTTTGCCCGATCGAAACGCCGG
AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGGCCGCTTATGCGCGCACCAACC
AGTACGGCTTCCTCGAGAGCCCGTACCGTGTGGTGAAGACGCTCTGGTCACCG
ACGAGATCGTGTTCTGTCCGCCATCGAAGAAGCGTGATCACGTGATCGCTCAG
GCCTCGGCCACGATGAACGACAAGAAAGTCCTGATCGACGAGCTGAGGTAGCT
GTTCGTCACTTGAACGAATTACCCGTGAAGGA

RN63_rpoB

TTGTTTCATGGGGGCAGAACAACCCGCTCTCCGAGATCACCCACAAGCGCC
GTGTTTCTGCACTGGGCCCCGGGCGGTCTGACCCGTGAGCGTGCTGGCTTTGAGG
TTCGTGACGTACACCCGACGCACTACGGTCGTGTTTGCCCGATCGAAACGCCGG
AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGGCCGCTTATGCGCGCACCAACC
AGTACGGCTTCCTCGAGAGCCCGTACCGTGTGGTGAAGACGCTCTGGTCACCG
ACGAGATCGTGTTCTGTCCGCCATCGAAGAAGCTGATCACGTGATCGCTCAGG
CCTCGGCCACGATGAACGACAAGAAAGTCCTGATCGACGAGCTGGTAGCTGTCC
GTCACCTTGAACGAATTACCCGTGAAGGA

RN69_rpoB

TAGTTCATGGGGGCCAGAACAACCTGCTCTCCGAGATCACCCACAAGCGC
CGCGTCTCCGCACTCGGCCCTGGCGGTCTGACCCGTGAGCGTGCCGGCTTCGAA
GTCCGTGACGTACACCCGACCCACTACGGCCGTGTGTGCCCGATCGAGACCCCT
GAAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGGCAGCCTATGCCCGCACCAAC

CAGTACGGCTTCCTGGAAAGCCCGTACCGCGTGGTGAAGGAAGGCGTGGTCAG
CGACGACATCGTGTTCTGTCTGGCCATTGAAGAAGCGGATCATGTCATCGCCCA
GGCTTCGGCCGCGATGAACGAGAAGAAGCAACTGATCGATGAGCTGAGTAGCT
GTTCGTCACCTGAACGAATTACCCCGTGAAGGA

RN130_rpoB

TAGTTCATTGGGCCAGAACAACTGCTCTCCGAGATCACCCGATCACAGCG
CCGCGTCTCCGCACTCGGCCCTGGCGGTCTGACCCGTGAGCGTGCCGGCTTCGA
AGTCCGTGACGTACACCCGACCCACTACGGCCCGTGTGTGCCCGATCGAGACCCC
TGAAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGGCAGCCTATGCCCCGCACCAA
CCAGTACGGCTTCCTGGAAAGCCCGTACCGCGTGGTGAAGGAAGGCGTGGTCA
GCGACGACATCGTGTTCTGTCTGGCCATTGAAGAAGCGGATCATGTCATCGCCC
AGGCTTCGGCCGCGATGAACGAGAAGAAGCAACTGATCGATGAGCTGAGTACC
TGTTTCGTCACCTGAACGAATTACCCCGTGAAGGA

Annexe 4 : Les plantes aromatiques et médicinales du Sud

Marocain testées pour leur activité antibactérienne

Code de la plante	Nom scientifique	Nom commun	Nom vernaculaire	Famille
 78 ; 101 ; 94	<i>Lavandula coronopifolia</i>	Lavande	Taymerza/lekhzama /Edghé	Lamiaceae
 108 ; 25	<i>Lavandula stoechas</i>	Lavande à toupet	Taymerza/lekhzama /Edghé	Lamiaceae
 3	<i>Lavandula maroccana</i>	Lavande	Iguiz	Lamiaceae
 63 ; 30	<i>Thymus satureioides</i>	Thym sariette	Tazouknit (Zaetra)	Lamiaceae
 34	<i>Thymus leptobotrys</i>	Thym	Azoukani	Lamiaceae
 83	<i>Anvillea radiata</i>	-	Noug L'heure (arabe) Ajri/Gijou/ Anderoual (Amazigh)	Asteraceae
 90	<i>Cotula cinerea</i>	-	L-guertofa	Asteraceae

 53	<i>Inula viscosa</i>	Inule visqueuse	Terhalâ / Mâgrâmân Bagramane / amagramane	Asteraceae
 89	<i>Artemisia inculta</i>	Armoise blanche	Chih/ Ifsi	Asteraceae
 68	<i>Asteriscus graveolens</i>	Tounresol	Nougð	Asteraceae
 91	<i>Ononis natrix</i>	Burgane jaune	Afezdade	Fabaceae
 62	<i>Ceratonia siliqua</i>	Caroubier	Tikida	Fabaceae
 73	<i>Acacia raddiana</i>	Accacia	Amrad/Tifizza/Telh/ Tifizzet	Fabaceae
 86	<i>Psoralea bituminosa</i>	Psoralée bitumineuse (à odeur de goudron)	-	Fabaceae
 98	<i>Coronilla terminalis</i>	Coronille glauque	-	Fabaceae
 76	<i>Fagonia harpago</i>	-	Tlehet Jloud	Zygophyllaceae

 93	<i>Fagonia zilloïdes</i>	-	T1eha Ithemra / Taierkent	Zygophyllaceae
 71 ; 104	<i>Zygophyllum gaetulum</i>		L-ôaggaya	Zygophyllaceae
 7	<i>Rubus ulmifolius</i>	Ronce à feuilles d'orme	Atoute	Rosaceae
 43	<i>Rosa canina</i>	Eglantier (Rosier des chiens)	Tabgha / Tighfert	Rosaceae
 19	<i>Sanguisorba minor</i>	-	-	Rosaceae
 114	<i>Cistus monspeliensis</i>	Ciste de Montpellier	-	Cistaceae
 107	<i>Cistus crispus</i>	Ciste crépu	+	Cistaceae
 2	<i>Halimium antiatlanticum</i>	-	-	Cistaceae
 26 ; 26□	<i>Pistacia atlantica</i>	Pistachier de l'atlas		Anacardiaceae
 106	<i>Cleome africana</i>	Cléome épineux	Rremt / âssây	Capparaceae
 100	<i>Limoniastrum ifniensis</i>	-	-	Plumbaginaceae

	67	<i>Colocynthis vulgaris</i>	Coloquinte	Handal / Hadja	Cucurbitaceae
	99	<i>Reseda alba</i>	Réséda blanc	Tanekfait	Resedaceae
	105	<i>Withania adpressa</i>	-	Lbayda/lirremt/Hjijou	Solanaceae
	92	<i>Ruta tuberculata</i>	Rue	L-Fijell / Aouermi / L-ouerm	Rutaceae
	81	<i>Hammada scoparia</i>	Saligne à balai	Rremt / Tassayt / Assay	Chenopodiaceae
	79	<i>Linaria sp</i>	Linaire indéterminée	-	Scrophulariaceae
	65	<i>Ighermia pinifolia</i>	-	-	Asteraceae

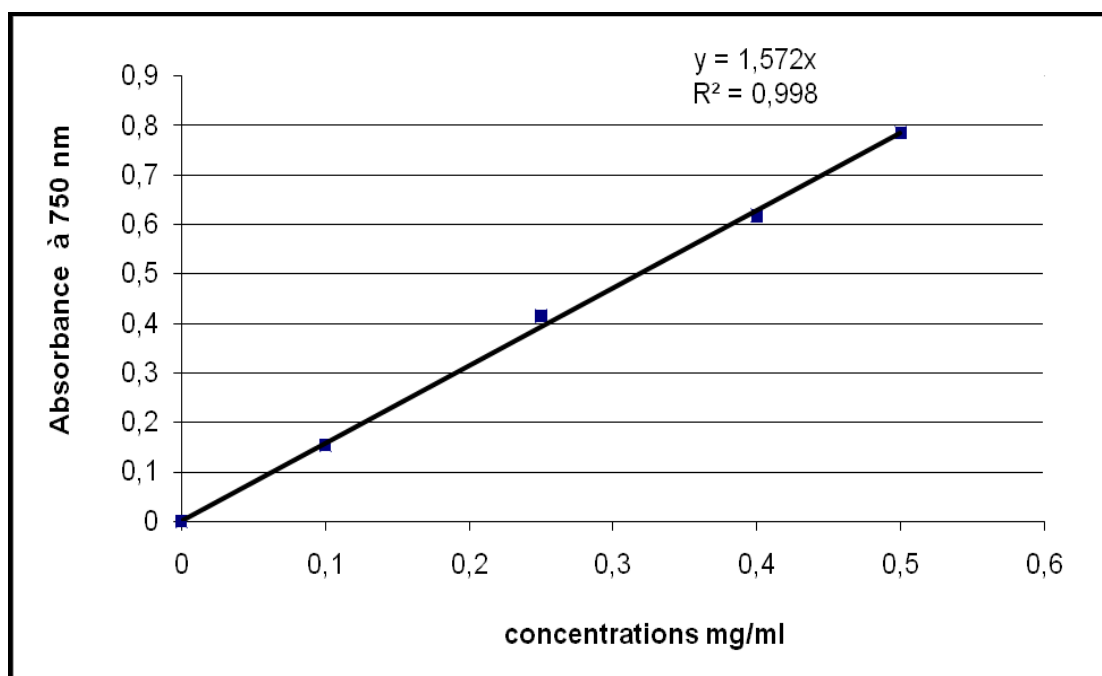
Annexe 5 : Gammes étalons dosages

Gamme étalon acide caféique :

- Absorbance de la gamme de concentration de l'acide caféique :

Concentrations (mg ml ⁻¹)	Absorbance à 750 nm
0	0
0,1	0,153
0,25	0,415
0,4	0,618
0,5	0,785

- Courbe étalon de l'acide caféique :

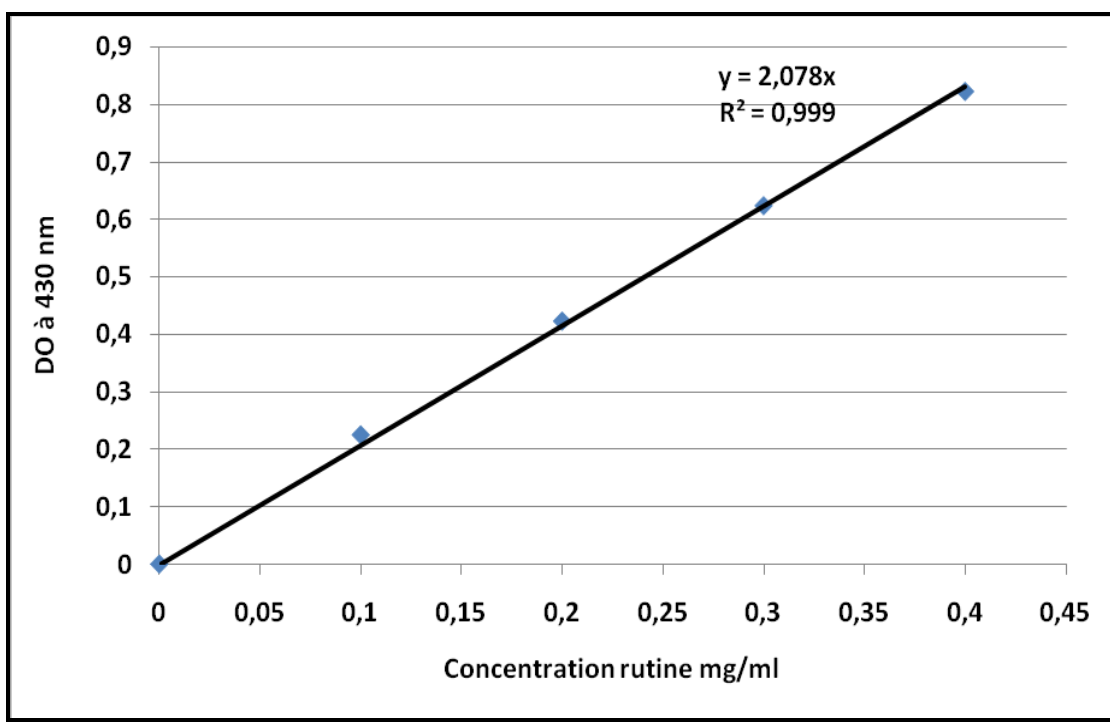


Gamme étalon rutine :

- Absorbance de la gamme de concentration de la rutine :

Concentrations (mg ml ⁻¹)	Absorbance à 430 nm
0	0
0,1	0,225
0,2	0,423
0,3	0,624
0,4	0,823
0,5	0,951

- Courbe étalon de la rutine :

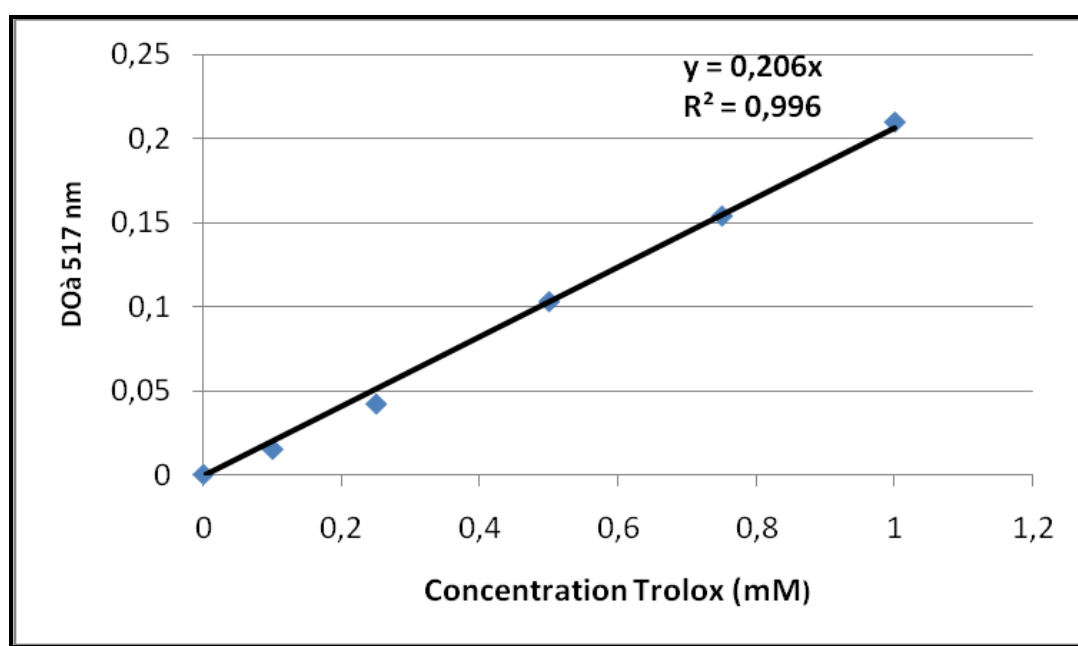


Gamme étalon Trolox :

- Absorbance de la gamme de concentration de la Trolox :

Concentrations (mM)	Absorbance à 517 nm
0	0
0,1	0,015
0,25	0,042
0,5	0,103
0,75	0,154
1	0,21

- Courbe étalon de la Trolox :



Annexe 6 : Publications

World J Microbiol Biotechnol
DOI 10.1007/s11274-009-0270-5

ORIGINAL PAPER

Screening for fluorescent pseudomonades, isolated from the rhizosphere of tomato, for antagonistic activity toward *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

N. Amkraz · E. H. Boudyach · H. Boubaker ·
B. Bouizgarne · A. Ait Ben Aoumar

Received: 8 June 2009 / Accepted: 30 November 2009
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

Abstract Bacterial canker of tomato, caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, continues to be a problem for tomato growers in the Souss-Massa Draa valley, South of Morocco. Assuming that biological control is an alternative for the management of this disease, a total of 303 fluorescent pseudomonads strains isolated from roots and rhizospheric soil of tomato plants were in vitro tested against *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Fluorescent pseudomonads strains which showed the highest antagonistic properties were thereafter investigated for their ability to colonize tomato roots. Our results showed that fluorescent pseudomonads are more represented in rhizospheric soils. However, the most efficient fluorescent pseudomonads isolates were found in the rhizoplane soil and the endorhizosphere. Among 42 spontaneous antibiotic resistant mutants obtained by treatment of the wild-type isolates with five antibiotics (rifampicine, nalidixic acid, ampicilline and chloramphenicol), 28 completely colonized the roots of all tomatoes seedlings used in this investigation. The 42 wild type isolates were then used for in vivo screening with the cotyledon test. Using this test, eight isolates from 42 tested induced a significant decrease of disease incidence and disease symptoms. The eight efficient isolates were then tested for their effectiveness in the protection of tomato plants in pots under greenhouse conditions. Results obtained showed that all tested isolates applied as seed and root treatments reduced significantly ($P \leq 0.001$) the incidence of bacterial canker.

Keywords Bacterial canker · Biological control · *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* · Fluorescent pseudomonads · Tomato plants

Introduction

Bacterial canker of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill), caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Davis et al. 1984) has been reported in the most tomato growing areas in the world (Gleason et al. 1993; Menzies and Jarvis 1994). It's incidence in Morocco has been reported since 1942 (Berger 1942) where is a very important factor of crop yield loss in the region of Souss-Massa Draa valley, Agadir, Morocco (Fatmi and Schaad 2002). A few commercially grown cultivars have significant tolerance or resistance to *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, (Gleason et al. 1993) while control methods include planting of disease-free seeds, removal of infected plants, good hygiene in the greenhouses, disinfection of pruning and pollinating tools, and application of chemical pesticides (Menzies and Jarvis 1994). In recent years, biological control including bio fumigation (Zanón and Jordá 2008), use of plant extracts (Ameziane et al. 2007) and use of plant growth promoting microorganisms (Weller 1988; Ferrona and Deguine 2005; Verma et al. 2007; Trivedi et al. 2008; Ahmad et al. 2008) becomes a potential method for the control of crop diseases. Recently, many works on bio-control of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* had been reported; eradication of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* by incorporating fresh crop debris into soil (Zanón and Jordá 2008); use of *Bacillus subtilis* (Quadra 136), *Trichoderma harzianum* (RootShield) and lysozyme to prevent the incidence of bacterial canker of tomato under greenhouse conditions (Utkhede and Koch (2004); seed

N. Amkraz · E. H. Boudyach · H. Boubaker · B. Bouizgarne
(✉) · A. Ait Ben Aoumar
Faculté des Sciences, Laboratoire de Biotechnologie et
Valorisation des Ressources Naturelles (LBVRN), BP 8106, cité
Dakhla, Agadir 80 000, Morocco
e-mail: bouizgarnebrahim@yahoo.fr

Published online: 12 December 2009

 Springer

treatment with antagonistic *Pseudomonas fluorescens* (Umesha 2006); seed treatment followed by root treatment with fluorescent pseudomonads before transplanting (Boudyach et al. (2004). Fluorescent pseudomonads are ubiquitous bacteria that are common inhabitants of rhizosphere, and are the most studied group within the genus *Pseudomonas* (Weller 1988). They could prevent proliferation of phytopathogens and stimulate plant growth by facilitating either uptake of nutrients from soil or producing certain plant growth promoting substances (Weller 1988; Barnett et al. 1999; Sutra et al. 2000; Mercado-Blanco et al. 2004; Dey et al. 2004; Boudyach et al. 2004; Ferrona and Deguine 2005; Verma et al. 2007; Ahmad et al. 2008; Trivedi et al. 2008).

According to Cook (1993), the search of microorganisms from the root or rhizosphere of a specific crop could lead to the isolation of effective antagonists against pathogens in this specific area which could be adapted to the plant species as well as the particular environmental conditions. Thus, the present work focuses on the research for efficient biocontrol agents that are native to Morocco. It aimed (1) to isolate fluorescent pseudomonads from the rhizospheric soil of symptomless tomato plants located in plantations with high level of bacterial canker, (2) to investigate their in vitro potential antagonism towards *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* and (3) to evaluate their effectiveness in the protection of tomato plants under greenhouse conditions.

Materials and methods

Isolation of bacteria from tomato roots

Tomato root samples with the soil around were collected from several tomato fields from different regions in the Souss-Massa Draa Valley, Agadir, Morocco. Samples were collected during three periods: 1998, 1999 and 2000. Each sample corresponds to at least four healthy tomato plants from the same field. Samples were stored at 4°C before analysis. The bacterial communities of the rhizosphere (RS), the rhizoplane (RH) and the endorhizosphere (ER) were isolated as defined by Dommergues and Mangenot (1970). To isolate bacteria from the rhizosphere, 4.5 ml of sterile physiological water was added to 0.5 g of rhizospheric soil obtained by shaking roots and the mixture was agitated at 120 rpm for 2 min. To isolate bacteria from the rhizoplane, rhizospheric soil was dislodged and 1 g of fresh root segments was agitated for 2 h in 10 ml of sterile physiological water. To isolate bacteria from the endorhizosphere, these root segments were subsequently surface disinfected with 2.5% sodium hypochlorite solution during 3 min (Mew and Rosales 1986), washed three times with

sterile distilled water and 1 g blended in 10 ml of sterile physiologic water. Serial ten-fold dilutions were prepared from the several extracts (RS, RH and ER) and 0.1 ml of each dilution was seeded onto nutrient-broth yeast extract agar (NBYA) (Vidaver 1967), supplemented with 100 µg ml⁻¹ of cycloheximide to suppress fungi, for isolation and quantification of cultivable fast growing bacteria and onto King B medium to isolate and quantify fluorescent pseudomonads (King et al. 1954). Three replicates were made for each extract using the two media and plates were incubated at 26°C for 48 h. Results were expressed as colony forming units per gram (CFU g⁻¹) of dried rhizospheric soil or of fresh roots for rhizoplane and endorhizosphere. Fluorescent colonies on King B medium were sub cultured twice before storage at 4°C on yeast dextrose carbonate agar (YDC) (Jiménez et al. 2004) and at -80°C in 40% glycerol (Parke et al. 1986).

In vitro selection of antagonistic fluorescent pseudomonads

The *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* H195 used in this test was isolated from a symptomless tomato plant in the laboratory of Phytobacteriology, Agronomy and Veterinary Institute (IAV), Agadir Morocco. To maintain pathogenicity, this strain was regularly inoculated in healthy tomato leaflet (Boudyach et al. 2004). Fluorescent pseudomonads were screened for in vitro antagonism against the pathogen. A co-inoculation technique on NBYA as described by Boudyach et al. (2004) was used. Aliquots (10 µl) of the bacterial suspension from fluorescent pseudomonads isolates (10⁸ cfu ml⁻¹) was spotted onto NBYA and incubated for 24 h at 26°C. A suspension of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (10⁸ cfu ml⁻¹) was sprayed over the NBYA plates and the plates were incubated for an additional 24 h. Bacterial isolates showing an inhibition zone of the pathogen growth were selected. All selected fluorescent pseudomonads were coded and stored as described above.

Root colonization under controlled conditions

To investigate the ability of the selected fluorescent pseudomonads to colonize the roots of tomato plants in natural soil, spontaneous antibiotic-resistant mutants were obtained by transferring bacteria to KB medium containing the following antibiotics: rifampicine (100 µg ml⁻¹), nalidixic acid (100 µg ml⁻¹), ampicilline (100 µg ml⁻¹) and chloramphenicol (30 µg ml⁻¹) (Sigma chemical Co., St. Louis, MO). To prevent contamination by fungi, cycloheximide (100 µg ml⁻¹) was added to the medium. Colonies growing in this medium were transferred three additional times in the same medium and then stored as described previously. Seeds of tomato (cv. clause 27, France) were surface

disinfected with 2.5% sodium hypochlorite solution during 3 min (Mew and Rosales 1986) and air-dried for 12 h. Seeds were then treated with antibiotic resistant bacteria (10^8 cfu ml⁻¹) in Xantham gum 0.5% (Boubyach et al. 2001) and sown in disinfected cell trays (one seed per cell) containing a mixture of sand and peat (1:2 v/v). Controls consisted of Xantham gum treated seeds sown in the same conditions. All treatments were performed in 12 replicates. The trays were placed in an experimental greenhouse: photoperiod, 12 h; temperature, 10°C night and 28°C day, relative humidity (RH) 80% and were watered every 2 days and fertilized each week with a commercial nutrient solution (Poni NPK 20-20-20, Poni France). After 2 weeks (second leaf stage), the seedlings were removed carefully and loosely adhering soil was shaken off. Roots with their adhering soil were placed on KB medium supplemented with antibiotics and cycloheximide. The plates were incubated at 26°C for 48 h and root colonization was evaluated on the basis of the growth of the introduced fluorescent pseudomonads along the roots and percentage of colonized seedlings.

In vivo screening for antagonistic bacteria

In vivo screening of selected antagonistic pseudomonads was carried out by using the cotyledons test (Chaldecott and Preece 1983). Cotyledons test was conducted with 4 days old tomato seedlings; Cotyledons of each seedling were cut with a disinfected chisel preliminary immersed in one suspension (10^8 cfu ml⁻¹) of the pathogen isolate JS07 (Isolated from infected tomato plants during these study and showing a high level of disease incidence compared to the other isolates (data not showed). One hour after infection with the isolate JS07 a drop of one antagonistic isolate of selected fluorescent pseudomonads (10^8 cfu ml⁻¹) was put on the section surface. Treatments were performed in four replicates and the whole experiment was repeated three times. Negative controls consisted of seedlings inoculated with sterilized distilled water and positives controls consisted of those inoculated with pathogen alone. The cotyledons were then examined for disease symptoms (white raised blisters or cracked areas) (Chaldecott and Preece 1983).

Control of bacterial canker under greenhouse conditions

A modified method of Boubyach et al. (2001) was used. Tomato seeds of the susceptible cultivar Daniella (Spain), bacterized as previously described, were sown in disinfected cell trays (one seed per cell) containing a mixture of sand and peat (1:2 v/v). Non bacterized seeds were used as controls. The trays were placed in a greenhouse as

described before. Substrate infestation with the pathogen was performed using a suspension of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* JS07. Cultures of the pathogen were prepared on NBY agar medium and the suspension prepared from these cultures was added to a non-sterile mixture of sand (fine Souss sand) and fine peat (1:2 v/v) at a rate of $\sim 10^8$ cfu g⁻¹ of soil. The infested substrate was distributed in plastic pots (4 l/pot); and was covered with 5 cm of no infested substrate. Tomato seedlings (third leaf stage) were pulled out gently from cell trays and transplanted in the plastic pots (one seedling/pot). Immediately before the transfer of the seedlings, the roots were soaked for 3 min in a suspension (10^8 cfu ml⁻¹) of the fluorescent pseudomonads isolate previously applied to the seeds. Only the roots were at the contact of the infested substrate. All treatments were replicated ten times and the experiment was repeated four times. In order to minimize the environmental effects in the greenhouse, the pots were arranged in a completely randomized design. Plants were watered and fertilized as described above. Disease was monitored for 12 weeks and assayed as the percentage of seedlings showing any wilt symptoms. To confirm the bacterial canker attack, isolation of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* from the infested plants was made on *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* selective agar medium (Fatmi and Schaad 2002).

Statistical analyses

Counts of cultivable fast growing bacteria and fluorescent pseudomonads were compared using the Mann–Whitney test (Sutra et al. 2000). Data of root colonization were analysed using Newman and Keuls test after transforming percentage to arcsin squares. To evaluate data of the in vivo effectiveness of the fluorescent pseudomonads isolates in the reduction of the cotyledons desiccation, Dunnett's test at $P = 0.01$ was used. Percentage data (disease incidence) were arcsin squares transformed before analysis of variance at $P \leq 0.01$. A SIGMASTAT®, Functional 30-Day Trial Software, INC., Logi Labo, SYSTAT was used for theses statistical analysis.

Results and discussion

Isolation of aerobic bacteria and fluorescent pseudomonades from tomato roots

Bacterial populations were quantified in the samples collected from several plantations as described above. Numbers of aerobic bacteria were significantly superior to fluorescent pseudomonades for all samples. Bacterial counts in the rhizospheric soils of tomato plants reported

here were lower than those previously observed by other authors with other plants (Sutra et al. 2000) but the percentages of fluorescent pseudomonads among the aerobic bacteria isolated from the for the rhizosphere and the rhizoplane (7 and 20%, respectively) (Fig. 1) were similar to those reported in banana plants by Sutra et al. (2000). As previously reported by Boubyach et al. (2001), fluorescent pseudomonads were predominantly isolated from the rhizoplane. In our investigation, from a total of 303 fluorescent pseudomonads isolated from all samples 44% (134 isolates) were isolated from the rhizoplane, 31% (93 isolates) from the rhizosphere and 25% (76 isolates) from the endorhizosphere (Table 1). However, results on the abundance of bacteria in soils must be interpreted with care; a high variability has been observed when counting fluorescent pseudomonads in several replicate samples of the same soils (Sutra et al. 2000). This could be due to a heterogeneous distribution of bacteria in soil in relation with the agricultural practices and the use of chemicals products (Sutra et al. 2000).

Selection of antagonistic fluorescent pseudomonads

All 303 fluorescent pseudomonads isolates showed in vitro inhibitory activity against *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* H195 with 70% of these isolates (210 isolates) were obtained from tomato roots (RH + ER). Antagonistic strains produced clear defined inhibition zones that ranged from 2 to 40 mm on NBYA. Sixty-two strains developed inhibition zones ranging from 20 to 40 mm, 174 strains had inhibition zones ranging from 10 to 20 mm and 67 had inhibition zones ranging from 2 to 10 mm (Table 1). Xu and Gross (1986) showed that an inhibition zone equal to 13 mm is sufficient to constitute a very good criterion

Table 1 Repartition of the antagonistic fluorescent pseudomonads according to their inhibition extent and origin

Origin	Inhibition extents			Total	%
	20 ≤ IZ ≤ 40	10 ≤ IZ < 20	2 ≤ IZ < 10		
RS	22	58	13	93	30.7
RH	11	82	41	134	44.3
ER	29	34	13	76	25
Total	62	174	67	303	100
%	20.5	57.5	22	100	

IZ diameter of inhibition zone (mm), RS rhizospheric soil, RH rhizoplane, ER endorhizosphere

for the in vitro screening of antagonistic bacteria. In the basis of this criterion, more than a half of our collection may be selected. However, many authors reported that there is no correlation between the in vitro antagonism and suppression of plant disease in field. However, this criterion is considered to be important to isolate potential bio-control agents in association with others like colonization for example (Barnett et al. 1999).

Root colonization by selected fluorescent pseudomonads

Forty-two spontaneous antibiotic resistant mutants were obtained from the selected wild-type antagonistic fluorescent pseudomonads. Twenty-eight isolates (representing 67% of the spontaneous mutants and 12% of the antagonistic bacteria isolates) colonized all parts of roots of 100% of the seedlings while 10 colonized the main and lateral roots of 75% of the seedlings, one isolates colonized the main and lateral roots of 50% of seedlings and three isolates colonized the main and lateral roots of only 25% of seedlings (Fig. 2).

Weller (1988) described a good root colonizing strain as one which is able to colonize the whole root system, and can survive during several weeks in the presence of the natural micro flora. Schorth and Hancock (1982) reported that only 2–5% of bacteria isolated from roots were able to colonize the rhizosphere efficiently. Boubyach et al. (2001) showed that the percentage of colonized seedlings varied from 8 to 90%. Our experiments were conducted in natural soil (fine sand of Souss valley) in the aim to evaluate the ability of selected bacteria to confront the natural micro-flora. Results obtained showed that 67% of the spontaneous mutant and 12% of the selected antagonistic bacteria colonize all parts of roots. However, colonization patterns of our antagonistic bacteria must be developed by other studies including the quantification of the colonization in function of plants age, plant variety and presence or absence of the pathogen in order to

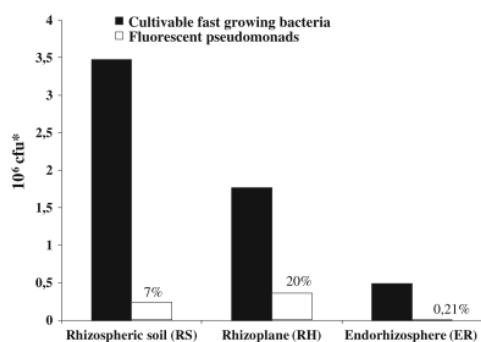


Fig. 1 Cultivable fast growing bacteria and fluorescent pseudomonads count in rhizospheric soil (RS), rhizoplane (RH) and endorhizosphere (ER). * Per gramme dry soil for RS and per gramme fresh roots for RH and ER

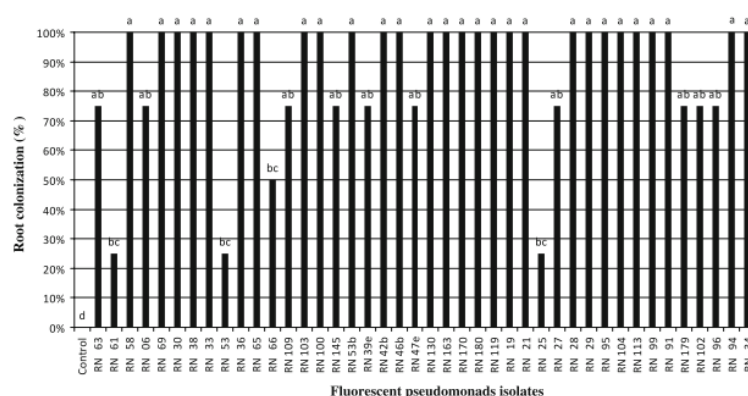


Fig. 2 Root colonization (percentage of colonized tomato seedlings) by the fluorescent pseudomonads isolates. Bars with the same letters are not significantly different at $P \leq 0.05$

optimise their efficiency in the control of the bacterial canker incidence.

In vivo screening of antagonistic fluorescent pseudomonads for tomato protection against *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

The cotyledon test was usefully applied to the testing of pathogenesis or virulence of bacterial isolates. Chaldecott and Preece (1983) reported that all pathogens isolates developed characteristic symptom after 3 days. The results obtained in our study showed that among 42 tested, eight fluorescent pseudomonads (RN 53b, RN 47e, RN 130, RN 42b, RN 39e, RN 63) decreased significantly the

incidence of the cotyledon desiccation. The decrease ranged from 33 ± 1.2 to $50 \pm 1.2\%$. However, there was no significant difference between the eight efficient isolates at $P = 0.01$ (Table 2). Those results support that cotyledon test may be a potential technique to in vivo screening of antagonistic fluorescent pseudomonads before the evaluation of the effectiveness of those biocontrol agents in greenhouse or field.

Evaluation of the efficiency of eight selected fluorescent pseudomonads

In these experiments, the eight fluorescent pseudomonads mutant isolates were tested, the first symptoms of the

Table 2 Effectiveness of eight selected fluorescent pseudomonads isolates in the reduction of cotyledons desiccation during in vivo experiments and in the reduction of bacterial wilt incidence and bacterial canker symptoms after seed and root combined treatment in greenhouse experiments

Treatments	Cotyledons desiccation (%) [*]	Disease incidence (%) ^{**}	Reduction of bacterial canker (%) ^{***}
Control	100.0 $\pm$ 0.0 ^a	65.4 $\pm$ 8.2 ^c	0.0 $\pm$ 0.0 ^A
Isolates			
RN 53b	41.67 $\pm$ 0.4 ^b	25.5 $\pm$ 1.0 ^d	61.0 $\pm$ 7.2 ^B
RN 47e	33.33 $\pm$ 0.1 ^b	22.5 $\pm$ 1.2 ^d	65.5 $\pm$ 7.0 ^B
RN 130	50.22 $\pm$ 0.1 ^b	21.0 $\pm$ 1.5 ^d	68.0 $\pm$ 6.7 ^B
RN 42b	41.67 $\pm$ 0.3 ^b	23.5 $\pm$ 1.2 ^d	64.0 $\pm$ 7.0 ^B
RN 39e	41.67 $\pm$ 0.3 ^b	13.5 $\pm$ 1.2 ^f	79.4 $\pm$ 7.0 ^D
RN 63	50.23 $\pm$ 0.3 ^b	18.0 $\pm$ 1.0 ^{d,e}	72.5 $\pm$ 7.2 ^{B,C}
RN 58	50.12 $\pm$ 0.3 ^b	16.5 $\pm$ 1.0 ^{d,e}	74.7 $\pm$ 7.2 ^{B,C}
RN 69	50.25 $\pm$ 0.3 ^b	11.0 $\pm$ 1.2 ^f	83.2 $\pm$ 7.0 ^D

^{*} Values with the same letters are not significantly different at $P = 0.01$

^{**} Values with the same letters are not significantly different at $P \leq 0.01$

^{***} Percentage of bacterial canker reduction compared to pathogen-only control. Values with the same letters are not significantly different at $P = 0.01$

bacterial canker were observed after 15 days in the control (untreated) tomato plants. In contrast, symptoms appeared on seed and root treated plants after 70 days. All the eight tested fluorescent pseudomonads isolates reduced significantly infection compared to the untreated control (Table 2). Incidence of the bacterial canker on the control was 65.4 ± 8.2 and this incidence varied from 11.0 ± 1.2 to 25.5 ± 1.0 in the plants treated with the fluorescent pseudomonads isolates. Percentages of reduction of the bacterial canker incidence ranged from 61 to 83.19%. The most efficient isolates were 39e and 69. Incidence percentage of the bacterial canker was 13.5 ± 1.2 and $11 \pm 1.2\%$, respectively. Boubyach et al. (2001) observed that the reduction of the infection of tomato plants by *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* reached 100% in the case of the seed treatment followed by a root treatment. The competition for substrate and space of the introduced bacteria was improved by this treatment of roots that increased the population of introduced antagonistic bacteria. Furthermore, competition for nutrients probably occurs in most interactions between fluorescent pseudomonads and pathogens on the root, and is partly responsible for the observed biocontrol by those bacteria. This hypothesis must be analysed by further studies including the three factors: biocontrol agent, pathogen and the host (tomato plant) in a simple and adapted models. In this optic Latour et al. (2003), indicated that rhizosphere-competent pseudomonads had a specific metabolism characterized by the efficiency of the pyoverdine mediated iron uptake and by the ability to reduce nitrogen oxides.

Conclusion

Although in this study we showed that the rhizosphere of tomato plants (from the Souss-Massa valley, South of Morocco) could be a source of fluorescent pseudomonads possessing potent antibacterial activities against the agent of bacterial canker of tomato in vitro and in greenhouse conditions, further studies are needed to confirm their effectiveness in field conditions. Actually, we studied the effectiveness of the two efficient fluorescent pseudomonads isolates (RN 69 and RN 39e) in the field, in the aim to choose a convenient method for their application as biopesticides and their use in formulation as biocontrol agent against the bacterial canker causal agent.

References

- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 163:173–181
- Ameziane N, Boubaker H, Boudyach EH, Msanda F, Jilal A, Ait Benaoumar A (2007) Antifungal activity of Moroccan plants against citrus fruit pathogens. *Agron Sustain Dev* 27(3):273–278
- Barnett SJ, Singleton I, Ryder M (1999) Spatial variation in population of *Pseudomonas Corrugata* 2140 and *Pseudomonads* on take-all diseased and healthy root systems of wheat. *Soil Biol Biochem* 31:633–636
- Berger G (1942) Une bactériose de la tomate nouvellement observée au Maroc. *Ann Epiphyt* 8:177–187
- Boubyach EH, Fatmi M, Akhayat O, Benizri E, Ait Ben Aoumar A (2001) Selection of antagonistic bacteria of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and evaluation of their efficiency against bacterial canker of tomato. *Biocontrol Sci Tech* 11: 141–149
- Boudyach EH, Fatmi M, Boubaker H, Ait Ben Aoumar A, Akhayat O (2004) Effectiveness of fluorescent pseudomonads strains HF 22 and HF 142 to control bacterial canker of tomato. *J Food Agr Environ* 2(3&4):115–120
- Chaldecott MA, Preece TF (1983) The use of a tomato cotyledon test to identify *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense*. *Plant Pathol* 32:441–448
- Cook RJ (1993) Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 31:53–80
- Davis MJ, Gillaspie AG, Vidaver AK, Harris RW (1984) *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 34:107–117
- Dey R, Pal KK, Bhatt DM, Chauhan SM (2004) Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiol Res* 159:371–394
- Dommergues Y, Mangelot F (1970) *Ecologie Micobienne du Sol*. Masson et Cie, Paris
- Fatmi M, Schaad NW (2002) Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in infected tomato stems in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathol* 51:149–154
- Ferrona P, Deguine JP (2005) Crop protection, biological control, habitat management and integrated farming. A review. *Agron Sustain Dev* 25:17–24
- Gleason ML, Gitaitis RD, Ricker MD (1993) Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. *Plant Dis* 77:1069–1076
- Jiménez O, Contreras N, Nass H (2004) *Xanthomonas albilineas* causal agent of sugarcane (*Saccharum* sp.) leaf scald disease in states Lara and Yaracuy. *Rev Fac Agro* 21:231–241
- King EO, Ward MK, Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* 44:301–307
- Latour X, Delorme S, Mirleau P, Lemanceau P (2003) Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of fluorescent pseudomonads: description of a strategy based on population and model strain studies. *Agronomie* 23:397–405
- Menzies JG, Jarvis WR (1994) Bacterial canker. In: Howard RJ, Garland JA, Seaman WL (eds) *Diseases and pests of vegetable crops in Canada*. The Canadian phytopathological society and the entomological society of Canada, Ottawa, pp 341–342
- Mercado-Blanco J, Rodríguez-Jurado D, Hervás A, Jiménez-Díaz RM (2004) Suppression of *Verticillium* wilts in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biol Control* 30:474–486
- Mew TW, Rosales AM (1986) Bacterisation of rice plants for control of sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 76:1260–1264
- Parke JL, Moen R, Rovira AD, Bowen GD (1986) Soil water flow affects the rhizosphere distribution of a seed-borne biological control agent, *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol Biochem* 18:583–588
- Schorth MN, Hancock JG (1982) Selected topics in biological control. *Annu Rev Microbiol* 35:453–476

- Sutra L, Risède JM, Gardan L (2000) Isolation of fluorescent pseudomonads from the rhizosphere of banana plants antagonistic towards root necrosing fungi. *Lett Appl Microbiol* 31: 289–293
- Trivedi P, Pandey A, Palni LMS (2008) In vitro evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugates*. *Microbiol Res* 163:329–336
- Umesha S (2006) Occurrence of bacterial canker in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatments on disease incidence. *Crop Prot* 25:375–381
- Utkhedde R, Koch C (2004) Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. *Biocontrol* 49:305–313
- Verma R, Naosekham AS, Kumar S, Prasad R, Shanmugam V (2007) Influence of soil reaction on diversity and antifungal activity of fluorescent pseudomonads in crop rhizospheres. *Bioresour Technol* 98:1346–1352
- Vidaver AK (1967) Synthetic and complex media for rapid detection of fluorescence of phytopathogenic *Pseudomonas*: effect of carbon source. *Appl Microbiol* 15:1523–1524
- Weller DM (1988) Biological control of soil borne pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann Rev Phytopathol* 26:379–407
- Xu GW, Gross DC (1986) Field evaluation of the interaction among fluorescent *Pseudomonas*, *Erwinia carotova* and potato yields. *Phytopathology* 76:423–430
- Zanón JM, Jordá C (2008) Eradication of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by incorporating fresh crop debris into soil: Preliminary evaluations under controlled conditions. *Crop Prot* 27(12):1511–1518

Full Length Research Paper

Antibacterial activity of moroccan plants extracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomatoes' bacterial canker

Talibi I., Amkraz N.*, Askarne L., Msanda F., Saadi B., Boudyach E. H., Boubaker H., Bouizgarne B. and Ait Ben Aoumar A.

Faculté des Sciences, LBVRN ; Laboratoire de Biotechnologie et Valorisation des Ressources Naturelles, BP 8106, cité Dakhla, Agadir, 80 000, Morocco.

Accepted 23 June, 2011

In search for alternative ways of tomatoes' bacterial canker control, we screened here forty medicinal and aromatic plants (MAP) sampled from 15 families, currently used in southern Moroccan traditional medicine, for their activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* the causal agent of this disease. The antibacterial efficacy of powders of these plants was determined *in vitro* using the agar plate's methods. Results obtained show that all the forty plants tested inhibited the bacterial growth of this pathogen with inhibition zone diameter ranging from 5 to 50 mm. Determination of the minimal inhibitory concentrations (MIC) and the minimal bactericidal concentrations (MBC) of the most effective plants indicates that there plants gender *Rubus*, *Anvillea* and *Pistacia* have the lower MIC which is equal to 3,125 mg ml⁻¹. The other plants (*Lavandula coronopifolia*, *Lavandula stoechas*, *Rosa canina*, *Cistus monspeliensis* and *Cistus crispus*) had a MIC equal to 6.25 mg ml⁻¹. The MBC for different plants tested are between 6.25 mg ml⁻¹, case of *Rubus ulmifolius* and 25 mg ml⁻¹. The germination percentage of seeds treated with the most efficient three plants extracts was significantly higher than the untreated. Seeds treated with the extract of *L. coronopifolia* gave the higher germination rate (98%). The rate germination is 84 to 88% respectively for *Cistus monspeliensis* and *Rubus ulmifolius*. In other hand population size of the bacterium in the seeds' surface was significantly reduced compared to the controls for the three treatments, when tomato seeds were artificially inoculated with the pathogen before being treated with the plants extracts (aqueous extracts).

Key words: Bacterial canker, tomato, medicinal plants, biological control.

INTRODUCTION

The tomato crop is subject to attack by a multitude of pathogenic microorganisms and its intensive culture has generated and amplified the phytosanitary problems. In addition to mushrooms, viruses and deleterious organisms, pathogenic bacteria are important factors that reduce the quality and performance of this culture (Gartemann et al., 2003). The bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) (Davis et al., 1984), account among the most important phytosanitary tomato problems. It is a very contagious

and destructive disease in tomato crop both under controlled and field cultures (Utkhede and Koch, 2004). The bacterial canker can cause significant damage which may go up to the destruction of 100% crop (Gitaitis, 1990; Chang et al., 1992). In Morocco, all tomato production areas are contaminated by this pathogen, whose seriousness varies following regions (Fatmi et al., 1989). In the Souss-Massa Draa region, it has become the main cause of the premature death of tomato (Fatmi, 1989). The seeds and infected transplants are the primary sources of primary inoculums of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Bryan, 1930; Gleason et al., 1991). Bacteria can survive in the soil (Bryan, 1930; Chang et al., 1992; Strider, 1967; Farley, 1971), in crop residues

*Corresponding author. E-mail: amkrazn@yahoo.fr.

and multiple alternative hosts (Fatmi and Schaad, 2002). The spread of the disease is ensured by various manipulations like transplantation (Gitaitis, 1990; Gitaitis et al., 1991), phytosanitary treatments and irrigation systems (Strider, 1969; Chang et al., 1992). The chemical treatments recommended for this disease only reduced the population of the pathogen in the surface of the infected plants (Hausbeck et al., 2000). Although the control of this bacterial disease continues to be difficult, prevention was the first defense line. Given the inefficiency of chemical treatments and their impact on health and the environment, research and development of alternative methods are recommended. The biocontrol is a promising way and much research works were made worldwide against bacterial canker agent and various plant pathogens and encouraging results were found (Amkraz et al., 2010; Taqarort et al., 2008; Ameziiane et al., 2007; Basim et al., 2006; Umesha, 2006; Utkhede and Koch, 2004; Dimitra et al., 2003; Boudyach et al., 2004; Ali-Emmanuel et al., 2002; Boudyach et al., 2001). With a view to develop effective natural treatments, natural extracted substances from plants figure as privileged axes of the biological control of plant pathogens both in crop treatments and in post harvest managements. The objective of this study is to select among plants harvested in different regions Morocco those which extracts inhibit the growth of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* and to assess their activity *in vitro*. We are also looking for a biological alternative to the chemical to eradicate the pathogen from the seeds surface considered to be the primary source of infection; in the aim to have a certified seeds without *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

MATERIALS AND METHODS

Plant sampling and preparation of the plants extracts

The prospecting and collection of the medicinal plants were conducted during the years 2006, 2007 and 2008 from several regions of Souss-Massa Draa Valley, Agadir, Morocco. The plants harvested were placed in clean plastic bags and numbered. After identification in the laboratory, the samples were dried in the shade and in damp shelter for a week, followed by a drying in an oven at 35°C for one night. After drying, different parts of the plants were transformed to powder. 20 g of powder were put into suspension in one beaker 250 ml containing 60 ml of distilled water. All was brought to a boil during 5 min. Then, the obtained suspensions were double filtered utilizing the gauze followed by filter paper (Whatmann no 1). The filtrate thus obtained was dried in an oven at 60°C to get dry extract. The stock solution of each extract corresponded to a concentration of 0.5 g dry extract in 1 ml of distilled water (Ali-Emmanuel et al., 2002).

Screening for the antibacterial activity of the aqueous extracts

The paper disc diffusion method was used to detect the antibacterial activity of plants extracts. One suspension of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* H195 isolate (Boudyach et al., 2004) was prepared in the sterile physiological water from a young

culture of 72 h on the NBY medium. The optical density of bacterial suspension was adjusted to 0.46 at 610 nm to have 10^8 cfu ml⁻¹ (Umesha, 2006). A volume of 0.1 ml of the suspension was spread in the medium surface with sterile glass beads. Cultures prepared were subsequently placed in an incubator at 25°C for 30 min. Sterilized filter paper discs (Whatmann no 3 and 5 mm in diameter) were soaked with 10 µl of a 10% concentration of each plant aqueous extract. Discs were placed in the middle of Petri plates containing pathogen dried cultures prepared previously. Distilled water was used as negative controls. The plates were incubated at 25°C and observed after 48 to 72 h. At the end of the period, inhibition zones around the paper discs were measured and compared to the controls. All tests were conducted in fifteen repetitions arranged as five paper discs in three plates for each extract.

Determination of the MIC and the MBC of the efficient plants

The minimal inhibitory concentrations (MIC) of aqueous plants extracts were determined in liquid medium (Schaad et al., 1995). One suspension of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (H195 isolate) in exponential growth phase, adjusted to 10^8 cfu ml⁻¹ was distributed into sterile hemolytic tubes 3.6 ml per tube. A volume of 0.4 ml from the stock solution of the plant extract was added to each tube. We performed a series of 1/2 dilution. The final concentrations range between 50 and 3,125 mg l⁻¹. Controls consisted in tubes with the pathogen suspension without extract. The tubes were then incubated at 25°C during 24 h. After incubation, the first tube showing visible growth to the naked eye was retained as corresponding to the MIC for each plant.

The minimal bactericidal concentration (MBC) was determined by spreading 10 µl, taken from the MIC tubes, on the NBY agar. The percentage of viable germs was estimated comparing with controls performed with decimal dilutions of the bacterial suspension in order to obtain a range suspension of bacterial concentrations between 100 and 0.01%. Each dilution 10 µl was spread on NBY medium. Cultures thus made were incubated at 25°C for 72 h. The MBC that corresponds to the plant does allow extract concentration than 0.01% survival of the initial inoculum, was estimated by comparing the number of colonies appeared to that of the initial inoculum with the tenfold dilution series. The MIC of solvent extracts was determined during the previous assay; it corresponds to the lower concentration that inhibited *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* growth.

Effectiveness of the aqueous extract in the treatment of the tomato infected seeds

The three best plants which extracts inhibit the growth of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* were used for treating infected tomato seeds. The treatment of seeds and assessment of their germination capacity were made using the method of Tobias et al. (2007) modified. Contaminated tomato seeds were mixed with the aqueous extract of each plant at a concentration of 500 mg ml⁻¹ for one hour. Seeds were subsequently dried and then planted in alveolus terrines fulfilled with mixture of sand soil and peat (1: 2; v/v). Each treatment was repeated 17 times and each test was repeated three times. Controls were carried out under the same conditions with seeds dipped in distilled water. The terrines were placed in an experimental greenhouse with randomized design blocs and were watered once every two days. After two weeks, the percentages of the germinated seeds were determined for each treatment.

The second stage of this experiment was to assess the capacity of the extracts to eliminate the bacterium from the surface of the infected seeds. Artificial inoculated tomato seeds (cv. Close 27)

with the pathogen isolate suspension at 10^8 cfu as described in Amkraz et al. (2010) were mixed to plant extracts as described previously. After getting dried for one night under a stream of sterile air, three samples of 5 seeds by treatment were macerated separately in 1 ml of phosphate buffer (0.05 MPO_4^{3-} , pH 7.4) in a sterile mortar and bacterial density in the wash buffer was determined by serial dilutions on NBY agar medium. Control was performed with untreated seeds. Results were expressed as log cfu seed⁻¹.

Statistical analyses

All data were subjected to statistical analysis of variance ANOVA using STATISTICA software, version 6, Stat-Soft, 2001, France. Percentage values were subjected to arcsine-square transformation before analysis of variance. Means separation was performed following the Newman and Keuls test at $P < 0.05$.

RESULTS

Prospecting and collection of plant material

Our plants collection consists of 40 samples harvested in different areas of South Moroccan during years 2006, 2007 and 2008. Plants harvested belonged to fifteen families represented mainly by the Lamiaceae (22.5%), the Asteraceae (12.5%) the Fabaceae (12.5%), Rosaceae (10%), Zygophyllaceae (10%) and the Cistaceae (5%) (Table 1).

Evaluation of the antibacterial activity of plant extracts

The antibacterial efficacy of tested plants was determined *in vitro* using the agar plate's methods. Results obtained show that among the forty plants tested, the aqueous extracts of all 40 plants inhibited the bacterial growth of this pathogen with inhibition zone diameter ranging from 5 to 50 mm (Table 1 and Figure 1).

Determination of the MIC and MBC

This test was performed with the best plants that have inhibited the growth of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. The results obtained were presented in Table 2. From these results the plants gender *Rubus*, *Anvillea* and *Pistacia* have the lower minimum concentration which is equal to 3.125 mg ml^{-1} . The other plants (*Lavandula coronopifolia*, *Lavandula stoechas*, *Rosa canina*, *Cistus monspeliensis* and *Cistus crispus*) had a MIC equal to 6.25 mg ml^{-1} . The MBC for different plants tested were between 6.25 mg ml^{-1} , the case of *Rubus ulmifolius*, and 25 mg ml^{-1} for others; *L. coronopifolia*, *L. stoechas*, *R. canina*, *A. radiata*, *Cistus monspeliensis* germination and growth of some phytopathogenic fungi and *C. crispus*.

Effectiveness of the aqueous extract in the treatment of the tomato infected seeds

Two weeks after their sowing, seeds germinate but with some differences related to the kind of treatments to which they are subjected (Figure 2). The result showed that the percentage of germinated seeds treated with the three plant extracts is significantly higher than the untreated. Seeds treated with extract *L. coronopifolia* have the highest rate of germination (98%), while germination rates are 84 and 88% respectively for *C. monspeliensis* and *R. ulmifolius*. The population size of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* in the surface of the infected seeds decreased significantly after the treatment with the plant extracts compared to the untreated (Table 3). The most efficient decrease was observed with *L. coronopifolia* with 72.32% control.

DISCUSSION

In this study we have tested the antibacterial activity of 40 plants harvested in various Moroccan southern regions against *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, agent of the tomato bacterial canker. The *in vitro* effect of aqueous and solvent extracts of these plants showed that 90% inhibit the growth of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, but to some different proportions. The genus *lavandula* was the best gender inhibiting growth of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. This result concurred with those of Daferera et al. (2003) who reported that Lavender presents an antibacterial effect against some plants pathogens. The essential oil of *Lavandula angustifolia* inhibits completely *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* growth 600 mg ml^{-1} (Daferera et al., 2003). This activity is mainly due to its bioactive compounds, particularly the linalool and acetate of linalyl (Daferera et al., 2003). The genus *Rubus* showed a significant *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* growth inhibition. Thiem and Goślińska (2004) reported that leaf extracts of *Rubus chamaemorus* had an antibacterial activity against some Gram negative bacteria. The *Rosa* kind showed also a strong *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* growth inhibition. Basim and Basim (2004) reported that essential oil of *Rosa damascena* can be used as a bactericidal for the control of fire blight of the rosaceas caused by *Erwinia amylovora*. Concerning the kind *Cistus*, Hannig et al. (2008) showed that *Cistus tea* has an antibacterial activity. This activity is due to the fact that this species is rich in polyphenoles, who had antibacterial properties. Similarly, Bouamama et al. (2006) reported that leaf extracts of *Cistus villosus* and *Cistus monspeliensis* have antibacterial properties against some Gram positive bacteria. Difference observed between samples of the same plant's species can be explained with the difference of the phytochemistry composition of plants samples due

Table 1. List of the forty plants used during present study with there biologic activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *Mchiganensis*.

Label N°	Botanical name	Family	Parts used	IZ diameter (cm) *
78; 101; 94	<i>Lavandula coronopifolia</i>	Lamiaceae	Stem, leaves and flowers	4.88 ± 0.19; 4.00 ± 0.00; 1.62 ± 0.04
7	<i>Rubus ulmifolius</i>	Rosaceae	Stem and leaves	4.05 ± 0.05
43	<i>Rosa canina</i>	Rosaceae	Stem and leaves	4.04 ± 0.05
114	<i>Cistus monspeliensis</i> L.	Cistaceae	Stem, leaves and flowers	3.86 ± 0.05
26; 26'	<i>Pistacia atlantica</i>	Anacardiaceae	Leaves	3.70 ± 0.17; 1.58 ± 0.10
83	<i>Anvillea radiata</i>	Asteraceae	Stem, leaves and flowers	3.55 ± 0.07
108; 25	<i>Lavandula stoechas</i>	Lamiaceae	Stem, leaves and flowers	3.33 ± 0.16; 3.07 ± 0.01
107	<i>Cistus crispus</i>	Cistaceae	Stem, leaves and flowers	3.20 ± 0.04
3	<i>Lavandula maroccana</i>	Lamiaceae	Stem and leaves	3.04 ± 0.00
90	<i>Cotula cinerea</i>	Asteraceae	Stem, leaves and flowers	2.86 ± 0.32
79	<i>Linaria</i> sp.	Scrophulariaceae	Stem and leaves	2.63 ± 0.00
65	<i>Ighermia pinifolia</i>	Asteraceae	Stem, leaves and flowers	2.59 ± 0.00
63; 30	<i>Thymus satureioides</i>	Lamiaceae	Stem and leaves	2.33 ± 0.24; 1.64 ± 0.05
81	<i>Hammada scoparia</i>	Chenopodiaceae	Stem and leaves	2.26 ± 0.03
53	<i>Inula viscosa</i>	Asteraceae	Stem and leaves	2.15 ± 0.29
89	<i>Artemisia inculta</i>	Asteraceae	Stem and leaves	2.10 ± 0.13
92	<i>Ruta tuberculata</i>	Rutaceae	Stem and leaves	2.09 ± 0.10
2	<i>Halimium antiatlanticum</i>	Cistaceae	Stem and leaves	2.06 ± 0.06
105	<i>Witania adpressa</i>	Solanaceae	Leaves	2.06 ± 0.08
34	<i>Thymus leptobotrys</i>	Lamiaceae	Stem, leaves and flowers	1.96 ± 0.17
76	<i>Fagonia harpago</i>	Zygophyllaceae	Stem, leaves and flowers	1.88 ± 0.08
91	<i>Ononis natrix</i>	Fabaceae	Stem and leaves	1.80 ± 0.03
71; 104	<i>Zygophyllum gaetulum</i>	Zygophyllaceae	Stem and leaves	1.73 ± 0.17; 1.25 ± 0.07
106	<i>Cleome africana</i>	Capparaceae	Stem, leaves and flowers	1.60 ± 0.14
62	<i>Ceratonja siliqua</i>	Fabaceae	Leaves	1.58 ± 0.01
73	<i>Acacia radiana</i>	Fabaceae	Leaves	1.28 ± 0.04
93	<i>Fagonia zilloides</i>	Zygophyllaceae	Leaves	1.27 ± 0.08
100	<i>Limoniastrum ifniense</i>	Plumbaginaceae	Stem and leaves	1.26 ± 0.08
86	<i>Psoralea bituminosa</i>	Fabaceae	Stem, leaves and flowers	0.90 ± 0.00
68	<i>Asteriscus graveolens</i>	Asteraceae	Stem, leaves and flowers	0.83 ± 0.19
67	<i>Colocynthis vulgaris</i> L.	Cucurbitaceae	Leaves	0.82 ± 0.14
19	<i>Sanguisorba minor</i>	Rosaceae	Stem and leaves	0.68 ± 0.14
99	<i>Reseda alba</i>	Resedaceae	Stem and leaves	0.50 ± 0.00
98	<i>Coronilla terminalis</i>	Fabaceae	Stem, leaves and flowers	0.50 ± 0.00

*Inhibition diameter of aqueous extracts on disc diffusion essay. Values are means of fifteen replicate ± σ arranged as five discs in three plates for each extract.

to the location, plant's age and season of the harvesting. Phyto chemical analyze of different extracts (essential oil, solvent extracts and aqueous extracts) of these plants with standard methods like GC/MS, HPLC and CCM (Data not showed) confirmed this hypothesis.

Our finding concurred with all those reported in the literature; the efficient genders in the inhibition of the bacterial canker agent were proved to have antibacterial proprieties both in human and plant diseases. As *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* is known to be transmitted through seeds of the plants (Gittaitis et al., 1993) important applications of the extracts can be seed protectors. The three plants tested here appear to be

promising in this respect; they have an improve action on the germination capacity of seeds and reduced significantly the viable pathogen cells from the surface of the treated seeds. Furthermore, the amount of the medicinal plant extracts to be used as a seed protectors for bacterial canker management will be very low comparing to their usage for foliar disease or soil that require much more spraying material (Basim et al., 2006).

Conclusions

This study led to showing that the South of Morocco is

Table 2. The MIC and MBC of plants which extracts have given the best degree of inhibition of the pathogen.

Test plants	IZ* (cm)	MIC (mg ml ⁻¹)	MBC (mg ml ⁻¹)
<i>Lavandula coronopifolia</i> (78)	4.88 ± 0.19 ^a **	6.25	12.25
<i>Rubus ulmifolius</i> (7)	4.05 ± 0.0 ^{5b}	3.125	6.25
<i>Rosa canina</i> (43)	4.04 ± 0.05 ^b	6.25	25.00
<i>Lavandula coronopifolia</i> (101)	4.00 ± 0.00 ^b	ND	ND
<i>Cistus monspeliensis</i> L. (114)	3.86 ± 0.05 ^{bc}	6.25	25.00
<i>Pistacia atlantica</i> (26)	3.70 ± 0.17 ^{bcd}	3.125	12.55
<i>Anvillea radiata</i> (83)	3.55 ± 0.07 ^{cde}	3.125	25.00
<i>Lavandula stoechas</i> (108)	3.33 ± 0.16 ^{def}	6.25	12.50
<i>Cistus crispus</i> (107)	3.20 ± 0.04 ^{efg}	6.25	25
<i>Lavandula stoechas</i> (25)	3.07 ± 0.01 ^{fg}	ND	ND
<i>Lavandula maroccana</i> (3)	3.04 ± 0.00 ^{fg}	ND	ND
<i>Cotula cinerea</i> (90)	2.86 ± 0.32 ^g	ND	ND

* Inhibition diameter of aqueous extracts on disc diffusion assay. Values are means of fifteen replicate ± σ arranged as five discs in three plates for each extract. **Values followed by different letters are significantly different according to ANOVA analyze with Newman & Keuls test at p<0.05. ND: not determined.

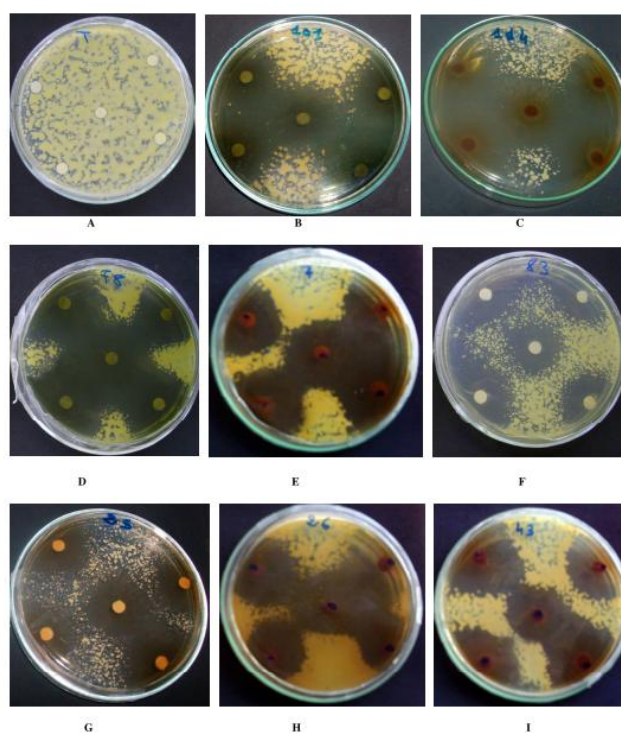


Figure 1. In vitro inhibition of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* growth with some plants' extracts. (A) Control, (B) *Lavandula coronopifolia* first sample, (C) *Cistus monspeliensis*, (D) *Lavandula coronopifolia* second sample, (E) *Rubus ulmifolius*, (F) *Anvillea radiata*, (G) *Lavandula stoecha*, (H) *Pistacia atlantica*, (I) *Rosa canina*.

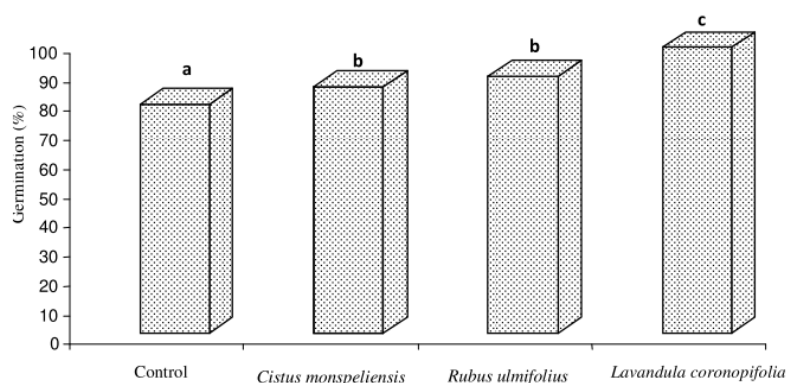


Figure 2. Effect of plants extracts on the germination of tomato seeds. The results are analyzed by the ANOVA followed by Newman and Keuls test at $P < 0.05$. Different letters indicate significantly different results.

Table 3. Effect of plants extracts on the population size of the pathogen in the surface of tomato seeds.

	Control	L.c.	R.u.	R.c.	C.m.	P.a.	A.r.	L.s.	C.c.
Population size of the pathogen (log cfu seed ⁻¹)	5.6±0.92 ^a	1.55±0.79 ^d	2.75±0.23 ^c	3.98±0.85 ^b	3.70 ±0.31 ^b	4.68±0.49 ^{ab}	4.83±0.54 ^{ab}	4.90±0.85 ^{ab}	5.19±0.54 ^{ab}

The results are analyzed by the ANOVA followed by Newman and Keuls test at $P < 0.05$. Different letters indicate significantly different results. L.c. *Lavandula coronopifolia*. R.u. *Rubus ulmifolius*. R.c. *Rosa canina*. C.m. *Cistus monspeliensis*. P.a. *Pistacia atlantica*. A.r. *Anvillea radiata*. L.s. *Lavandula stoechas*. C.c. *Cistus crispus*.

rich in species plant with a non-negligible antibacterial activity towards *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Indeed, the diameters areas of inhibition obtained on solid medium oscillate between 5 and 50 mm. The best results are obtained with plants appartenants to gender *Lavandula*, *Rubus*, *Rosa*, *Cistus*, *Pistacia* and *Anvillea*. The study of the impact of these plants on the viability of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* revealed that the best plants have both bacteriostatic and bactericidal effect. Treatment of tomato seed, infected by *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, by the three best plants extracts, had no negative influence on their germination capacity and reduced significantly the population of the pathogen from the surface of those seeds comparing to the untreated. Furthers studies were needed: Test of the essential oils activity on *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* growth and identify principle (s) responsible of the antibacterial activity of the best plants.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful for Pr. Hamdoun El Houseine

for his English correction. They also express there sincere thanks for the anonymous reviewers for their comments to improve the manuscript.

REFERENCES

- Ali-Emmanuel N, Moudachirou M, Akakpo AJ, Quetin-Leclercq J (2002). Activités antibactériennes *in vitro* de *Cassia alata*, *Lantana camara* et *Mitracarpus scaber* sur *Dermatophilus congolensis* isolé au Bénin. *Revue Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 55 (3): 183-187.
- Ameziane N, Boubaker H, Boudyach EH., Msanda F, Jilal A, Ait Ben Aoumar A (2007). Antifungal activity of Moroccan plants against citrus fruit pathogens. *Agron. Sustain. Dev.*, 27: 273-277.
- Amkraz N, Boudyach EH, Boubaker H, Bouizgarne B, Ait Ben Aoumar A (2010). Screening for fluorescent pseudomonades, isolated from the rhizosphere of tomato, for antagonistic activity toward *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26: 1059-1065. DOI 10. 1007/s11272-009-0270-5.
- Basim E, Basim H (2004) Evaluation of Antibacterial Activity of Essential Oil of *Rosa damascena* on *Erwinia amylovora*. *Phytoparasitica* 32(4): 409-412.
- Basim E, Basim H, Ozcan M (2006). Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *J. Food Eng.*, 77: 992-996.
- Bouamama H, Noël T, Villard J, Benharref A, Jana M (2006). Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. *J. Ethnopharma.*, 104: 104-107.
- Boudyach EH, Fatmi M, Akhayat O, Benizri E, Ait Ben Aoumar A

4338 J. Med. Plant. Res.

- (2001). Selection of antagonistic bacteria of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and evaluation of their efficiency against bacterial canker of tomato. *Biocon. Sci. Techn.*, 11:141-149.
- Boudyach EH, Fatmi M, Boubaker H, Ait Ben Aoumar A, Akhayat O (2004). Effectiveness of fluorescent *Pseudomonads* strains HF 22 and HF 142 to control bacterial canker of tomato. *J. Food. Agr. Environ.*, 2(3 and 4): 115-120.
- Bryan ME (1930). Studies on bacterial canker of tomato. *J. Agri. Res.*, 41: 825-851.
- Chang RJ, Ries SM, Pataky JK (1992). Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. *Phytopathology*, 76(1): 60-65.
- Davis MJ, Gillaspie AG, Vidaver AK, Harris RW (1984). *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34: 107-117.
- Dimitra J, Dafereraa BN, Ziogasb MGP (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, 22: 39-44.
- Farley JD (1971). Recovery of *Corynebacterium michiganense* from overwintered tomato stems by the excised-petiole inoculation method. *Plant Dis. Reporter*, 55: 654-656.
- Fatmi M, Schaad NW (2002). Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathol.*, 51: 149-154.
- Gartemann KH, Kirchner O, Engemann J, Gräfen I, Eichenlaub R, Burger A (2003). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *J. Biotech.*, 106: 179-191.
- Gitaitis RD (1990). Induction of a hypersensitive like reaction in four o'clock by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Dis.* 74: 58-60.
- Gitaitis RD, Beaver RW, Voloudakis AE (1991). Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Dis.*, 75: 834-838.
- Gleason ML, Braun EJ, Carlton WM, Peterson RH (1991). Survival and Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in Tomatoes. *Phytopathology*, 81(12): 1519-1523.
- Hausbeck MK, Bell J, Medina-Mora C, Podolsky R, Fulbright DW (2000). Effect of Bactericides on Population Sizes and Spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Tomatoes in the Greenhouse and on Disease Development and Crop Yield in the Field. *Phytophology*, 90: 38-44.
- Schaad UB, Abdus Salam M, Aujard Y, Dagan R, Green SD, Peltola H (1995). Use of fluoroquinolones in pediatrics: consensus report of an international Society of Chemotherapy commission. *Pediatr. Infect. Dis., J.*, 14(1): 1-9.
- Strider DL (1967). Survival studies with tomato bacterial canker of organism. *Phytopathology*, 57: 1067-1071.
- Strider DL (1969). Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganens*. A literature review and bibliography. North Carolina Agricultural Experiment Station. Tech. Bull., 193: 110.
- Taqarort N, Echairi A, Chaussod R, Nouaim R, Boubaker H, Ait Ben Aoumar A, Boudyach EH (2008). Screening and identification of epiphytic yeasts with potential for biological control of green mold of citrus fruits. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24:3031-3038.
- Thiem B, Goślińska O (2004). Antimicrobial activity of *Rubus chamaemorus* leaves. *Fitoterapia* 75: 93-95.
- Tobias A, Lehocski-Tornai J, Szalai Z, Csambalik L, Radics L (2007). Effect of different treatments to bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) in tomato, and bacterial spot (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) in pepper. *Int. J. Hortic. Sci.*, 13 (2):49-53.
- Umesha S (2006). Occurrence of bacterial canker in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. *Crop Protection*, 25: 375-381.
- Utkhede R, Koch C (2004). Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. *BioControl*, 49: 305-313.

Sélection des *Pseudomonas fluorescents* antagonistes de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* agent causal du chancre bactérien de la tomate

N. Amkraz; H. Boudyach; H. Boubaker Et A. Ait Ben Aoumar

Laboratoire de Biotechnologie et Valorisation des Ressources Naturelles, Faculté des Sciences, BP 8106, cité Dakhla, AGADIR 80 000, MAROC.
E-mail address: amkrazn@yahoo.fr

Résumé

Soixante-dix rhizobactéries antagonistes à *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (C.m.m.) sont isolées parmi les *Pseudomonas fluorescents* (P.F.) de la rhizosphère des plants de tomate saines situées dans un foyer de chancre bactérien. 74% de ces souches bactériennes proviennent des racines mêmes {Rhizoplan (RH)+Endorhizosphère (ER)}. Ces P.F. sont triées à base de leur pouvoir inhibiteur "in-vitro" de la croissance de C.m.m. en fonction du diamètre de la zone d'inhibition (compris entre 9 et 30mm) et de l'origine d'isolement (ER + RH), quatorze souches ont été sélectionnées. Or un bon agent de contrôle biologique doit arriver à coloniser le système racinaire de la plante à protéger avant la microflore indigène. Donc le pouvoir colonisateur des souches sélectionnées avait été évalué. Les souches antagonistes sont marquées dans un premier temps par la résistance à la Rifampicine. Sept souches seulement ont donné des mutants stables résistants à cet antibiotique : RN2, RN4, RN11, RN40, RN63, RN64, RN66. Ces mutants sont utilisés pour la bactérisation des semences de tomate (Var. *Daniella*). Le système racinaire des plantules, obtenues à partir des graines bactérisées avec les souches mutantes, est étalé sur le milieu KB amendé de l'antibiotique de marquage (La Rifampicine). Cinq souches sur sept forment des manchons continus autour des racines principales et secondaires de 75% des plantules. Les deux souches qui restent colonisent uniquement la racine principale de 25% des plantules. Les meilleures souches colonisatrices proviennent du Rhizoplan (RH) et de l'Endorhizosphère(ER).

Mots clés : – *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* - Lutte biologique – Antagonisme – *Pseudomonas fluorescents* – Colonisation racinaire.

Introduction

La tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) constitue la culture maraîchère la plus abondante dans la région du Souss-Massa-Daraa. Cette culture est exposée à plusieurs maladies dues à différents pathogènes (bactéries, champignons et virus). Le chancre bactérien de la tomate est l'une des maladies bactériennes les plus redoutables. Elle peut entraîner la mort prématurée des plants et une réduction du rendement. Cette bactériose est due à *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (C.m.m.) (Davis et al., 1984).

C.m.m. est une bactérie rencontrée dans la plupart des régions productrices de la tomate partout dans le monde (Strider, 1969). Elle est disséminée par la semence et peut survivre longtemps dans le sol (Fatmi et al., 1991). Aucun traitement efficace n'est disponible de nos jours. En outre, il est difficile de combattre le chancre bactérien une fois déclaré aux champs comme d'ailleurs toutes les maladies vasculaires.

La lutte biologique par protection du système racinaire en y introduisant des bactéries non pathogènes antagonistes de C.m.m., constitue une alternative potentielle. En effet, la possibilité de rendre un sol suppressif à une maladie en y introduisant des microorganismes s'avère très prometteuse, surtout à une époque où les traitements phytosanitaires chimiques suscitent une méfiance de plus en plus grande (Lugtenberg et Deweger, 1991, cité par susse, 1998).

La capacité des *Pseudomonas fluorescents* de coloniser rapidement la rhizosphère fait de ces bactéries un groupe taxonomique de grand intérêt pour leur utilisation en lutte biologique. Weller et al. (1988) ont isolé des *Pseudomonas fluorescents* qui éliminent la pourriture du blé causée par *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* en rendant le sol suppressif à ce pathogène et ceci par la production des antibiotiques et/ou des sidérophores. Loper, 1988 a montré que la souche 3551 de *P. fluorescens* migula isolée de la rhizosphère du Cotton sécrète un pigment fluorescent (sidérophore) qui inhibe *Pythium ultimum* agent causal de la fonte des semis de la plupart des plantes. Plusieurs autres études (Howell et al., 1980 ; Yuen et al., 1985 ; Deweger et al.,

1988 ; Becker et Cook, 1988 ; Gees et Coffey, 1989) ont montré que les *P. fluorescents* isolées de la rhizosphère des plantes peuvent être utilisées comme agents de contrôle biologique de plusieurs pathogènes.

L'objectif de notre étude est la recherche et la sélection des *Pseudomonas fluorescents* antagonistes de *C.m.m.* en vue de les utiliser en lutte biologique contre le chancre bactérien de la tomate.

Matériel et Méthodes

La première étape de notre travail vise l'isolement de l'agent pathogène, *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (*C.m.m.*), à partir des plantules de la tomate présentant les symptômes du chancre bactérien dans la région du Sous Massa Draa. Cet isolement se base sur l'utilisation d'un milieu semi-sélectif de *C.m.m.* (Fatmi et al; 1988) et sur l'aspect caractéristique de cette bactérie sur le milieu NBY solide.

La deuxième étape a pour objectif l'isolement de la flore bactérienne totale et des *Pseudomonas fluorescents* à partir du sol rhizosphérique (SR), du rhizoplan (RH) et de l'endorhizosphère (ER) de deux échantillons de sol (Lot I et Lot II) qui proviennent de deux exploitations agricoles de notre région.

La troisième étape est le Screening *in vitro* des *P.F.* isolées à base de leur inhibition de la croissance de *C.m.m.* sur milieu solide (contact direct).

La dernière étape est le triage qualitatif des souches antagonistes sélectionnées à base de leur aptitude à coloniser les racines de la tomate, pour ce faire nous avons suivie les étapes suivantes :

- Marquage des meilleures souches antagonistes par la résistance à la Rifampicine (repiquage successif sur des milieux de King B additionnés de concentrations croissantes de cet antibiotique).
- Bactérisation des semences de tomate (Var. Daniella) par les souches antagonistes marquées.
- Semis des graines bactérisées dans des terrines plastiques désinfectées et remplies d'un mélange 1/2 sable/ tourbe.
- Etalement du système racinaire entier de chaque plantule, au stade deuxième vrai feuille, sur le milieu KB additionné de l'antibiotique de marquage et du Cycloheximide.
- Estimation du degré de colonisation qualitativement par la détermination de l'étendue de la culture bactérienne autour du système racinaire.

Résultats

A partir des trois compartiments analysés pour les deux échantillons, nous avons isolé 70 souches de *P. fluorescents* grâce à leur fluorescence sur le milieu KB. Deux catégories de *P. fluorescents* sont isolées ;

celles qui ont un pigment fluorescent jaune verdâtre et celles qui ont un pigment fluorescent bleu selon l'espèce considérée (*putida*, *fluorescens* et *aeruginosa*).

74% de ces *P. fluorescents* sont isolées à partir des racines {Rhizoplan (RH) et Endorhizosphère (ER)} alors que 26% de ces bactéries sont isolées à partir du sol rhizosphérique (SR). La répartition de ces *P. fluorescents* selon leur origine est représentée dans le tableau 1 :

Tableau 1 :

Niveau de l'isolement		Nombre des souches de <i>P. fluorescents</i>	Fréquence (%)
Lot I	SR	16	23
	RH	20	28,6
	ER	14	20
Lot II	SR	2	2,8
	RH	5	7
	ER	13	18,6
Total		70	100

L'étude de l'activité antagoniste des 70 souches de *P. fluorescents* vis-à-vis de *C.m.m.* a montré que la grande majorité de ces souches inhibe la croissance de *C.m.m.* "in vitro". Le diamètre de la zone d'inhibition (ZI) varie entre 1mm et 30mm. Les limites des zones d'inhibition sont nettes pour la plupart des souches antagonistes sélectionnées.

Nous avons retenu les 34 souches antagonistes qui ont un diamètre de la zone d'inhibition (ZI) supérieur ou égal mal définies (inhibition liée à la diffusion des substances toxiques des antagonistes). à 6mm. Le Tableau 2 donne la répartition de ces antagonistes en fonction, d'une part, du diamètre de la zone d'inhibition, et d'autre part, de l'origine de l'isolement.

Tableau 2 :

Niveau de l'isolement	Nombre de souches par catégorie d'antagonistes		Total
	6mm ≤ ZI < 9mm	9 ≤ ZI ≤ 30mm	
SR	10	05	15
RH	08	03	11
ER	02	06	08
Total	20	14	34
(%)**	58,8	41,2	100

* : Diamètre de la zone d'inhibition.

** : Fréquence par rapport aux *P. fluorescents* antagonistes.

La colonisation constitue la deuxième étape du "Screening" à la recherche des agents du contrôle biologique. La sélection des souches bactériennes antagonistes est qualitative, elle est basée sur

L'importance de la croissance de la bactérie autour des systèmes racinaires des plantules de tomate. Pour réaliser cette étude

Parmi les sept mutants résistants à la Rifampicine 5 colonisent les racines principales et secondaires (latérales) de 75% des plantules. Les deux souches qui restent colonisent seulement 25% des plantules et elles sont présentes principalement en haut du système racinaire (Pivot). Le **tableau 3** représente la répartition des sept antagonistes en fonction de leur pouvoir colonisateur des racines des plants de tomate.

Tableau 3

Origine des Souches	Nombre des souches	Nombre de plants analysés	% des plants colonisés	Degré de colonisation
SR	3	36	75	++
RH	1	12	25	+
ER	2	24	75	+++
	1	12	25	++
Témoin	0	12	0	-

Discussion

Les isollements de *C.m.m.* réalisés à partir des échantillons prélevés des exploitations visitées sont tous positifs ce qui reflète le degré élevé d'infestation de ces exploitations et l'étendue de la maladie dans la région du Sous-Massa Drâa Maroc. Ces résultats concordent avec ceux des autres chercheurs qui ont travaillé sur le chancre bactérien dans cette région (Fatmi *et al.*, 1984). L'étendue de cette bactériose vasculaire dans notre région est expliquée par l'absence de moyens de lutte efficaces une fois déclarée au champ. Le seul moyen de lutte utilisé reste la prévention par l'utilisation de semences certifiées indemnes de *C.m.m.* (Gitaitis *et al.*, 1991) et la fumigation des sols par le Bromure de méthyle (Sridar, 1967). Ce dernier traitement (comme d'ailleurs tous les autres traitements phytosanitaires) peut avoir de très graves répercussions aussi bien sur la santé des consommateurs de la tomate (impact des résidus) que sur l'environnement (pollution et déséquilibres des relations qui régissent les écosystèmes) (Weller *et al.*, 1988). Ces dernières années, pour résoudre ces problèmes de la lutte chimiques, une autre méthode de lutte contre les phytopathogènes a été développée; c'est la lutte biologique. Les recherches entreprises dans le cadre de cette lutte ont montré que le groupe des *Pseudomonas* fluorescents renferme le plus grand nombre des antagonistes contre plusieurs pathogènes (Howell *et al.*, 1980; Kloepper *et al.*, 1980; Xu *et al.*, 1986; Loper, 1987; Becker *et al.*, 1988; Thomashow *et al.*, 1988; Weller *et al.*, 1988;

Conway *et al.*, 1989; Van peer *et al.*, 1991; Digat *et al.*, 1993; Pierson *et al.*, 1994 et Barnett *et al.*, 1999). Dans le souci d'augmenter les chances d'isoler des bactéries qui ont la capacité, d'une part, de coloniser les semences et les racines de la tomate, et d'autre part, d'exercer une action antagoniste vis-à-vis de *C.m.m.*; les prélèvements des échantillons ont été fait à partir de la rhizosphère des plants sains de tomate localisées au sein d'un foyer de chancre bactérien.

Les résultats du dénombrement des P.F. montrent l'abondance de ces bactéries au sein de la microflore totale (**Tableau 1**); Ce groupe représente en effet à peu près 10% de la microflore totale de l'échantillon I et 1% de la flore rhizosphérique de l'échantillon II. Digat et Gardan (1987) cité par Calmel (1996) rapportent que *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* peuvent constituer jusqu'à 60% de la flore rhizosphérique. La différence avec nos résultats peut être expliquée par l'utilisation des pesticides et des traitements chimiques notamment le Bromure de méthyle qui cause le déséquilibre au sein de l'écosystème plante-sol dans les exploitations d'où proviennent nos échantillons. La différence entre les deux lots d'échantillon est expliquée par la différence des traitements chimiques utilisés dans les deux exploitations même si le sol est le même (Sol sableux). Ce travail a permis l'isolement de 70 souches de *P. fluorescens* dont 74% proviennent des racines (Rhizoplan et Endorhizosphère) et 26% du sol rhizosphérique (**Tableau 1**). Donc les *Pseudomonas* fluorescents colonisent bien les racines de la tomate comme celles d'autre plantes tel que : le maïs, le pois, le soja... (Digat *et al.* 1993).

L'isolement des antagonistes potentiels dépend étroitement de la technique utilisée "in-vitro". Les 70 souches de *P. fluorescens* qui forment notre collection sont testées pour leur capacité d'inhiber la croissance de *C.m.m.* "in-vitro" sur le milieu de culture NBY. La méthode utilisée est adaptée à la croissance lente de *C.m.m.* et à la croissance rapide des P.F. sur le milieu NBY. Le milieu de culture NBY permet d'obtenir des zones d'inhibition claires et nettes pour la plupart des souches bactériennes étudiées. Le critère utilisé pour la sélection des antagonistes est le diamètre de la zone d'inhibition qui est lié à la production des molécules toxiques (sidérophores, antibiotiques...). 97% des 70 rhizobactéries isolées (soit 68 souche) induisent une zone d'inhibition dont le diamètre varie entre 1 et 30mm. Ce taux est largement supérieur à celui rapporté dans la littérature. En effet, Loper (1988) rapporte que seulement 9,5% des rhizobactéries (*P. fluorescens*) qu'il a isolé sont antagonistes à *Pythium ultimum*. Ce taux élevé des antagonistes que nous avons isolé traduit que la technique de recherche adoptée dans l'isolement de ces antagonistes est efficace et que la région de Souss-Massa Draa est pourvue de *P. fluorescens* inhibiteurs de *C.m.m.* associés à la culture de la tomate. En fonction de

l'importance de la zone d'inhibition, 48% (34 souches) ont une zone d'inhibition dont le diamètre est supérieur à 6 mm. Au sein de cette catégorie 41% (14 souches) des *P. fluorescents* induisent une zone d'inhibition dont le diamètre est supérieur à 9mm (Tableau 2). Xu et Gross (1986) ont rapporté qu'une zone d'inhibition dont le diamètre est de 13mm est suffisante pour constituer un critère de base pour la sélection de bons antagonistes in-vitro. Selon ce critère 30% des antagonistes sélectionnés dans notre étude entre dans cette catégorie, soit 10 souches. En fonction de l'origine d'isolement 55% des antagonistes sélectionnés (soit 19 souches) proviennent des racines (Rhizoplan + Endorhizosphère). A peu près 50% de ces antagonistes (9 souches) ont une zone d'inhibition dont le diamètre varie entre 9 mm et 30mm. D'après ces résultats l'origine de l'isolement ne semble pas affecter l'importance de la zone d'inhibition. Plusieurs auteurs (Wong et Baker, 1984 ; Barnet et al., 1999) ont rapporté qu'il n'y a pas une corrélation nette entre l'antibiose "in-vitro" et la suppression des maladies au champ par les *P. fluorescents*, mais il n'a pas été conclu non plus que l'antibiose "in-vitro" n'est pas un critère important dans la sélection des agents potentiels de lutte biologique. En effet l'antibiose "in-vitro" constitue toujours le critère de base de sélection des antagonistes potentiels, mais elle ne peut être utilisée comme l'unique critère de cette sélection (Barnet et al., 1999). Les agents potentiels de la lutte biologique doivent être capables de coloniser la rhizosphère des plantes à protéger (Suslow, 1982 et Fukui et al., 1994). La deuxième étape de ce "Screening" est donc l'évaluation des 14 antagonistes retenues à base de leur pouvoir colonisateur des plantules de la tomate. Les essais sont réalisés dans un substrat non stérile pour confronter les souches introduites avec les microorganismes indigènes du sol (Suslow, 1982 ; Loper, 1984 ; Chao et al., 1986 ; Bahme et al., 1987 ; Milus et al., 1991 ; Hofte et al., 1992 ; Fukui et al., 1994). 71% des 7 souches marquées par la résistance à la Rifampicine (soit 5 souches) colonisent les racines principales et secondaires de 75% des plantules. Les meilleures souches colonisatrices proviennent de l'endorhizosphère. Mais il reste difficile, d'après nos résultats, d'établir une corrélation entre l'origine de la souche et son pouvoir colonisateur. Par ailleurs le degré d'inhibition "in-vitro" n'est pas non plus corrélé au pouvoir colonisateur des souches étudiées. Ces souches ont presque le même pouvoir inhibiteur "in-vitro" (appartiennent à la même catégorie) mais elles sont différentes quant à leur aptitude à coloniser les racines des plantules de tomate. Ceci peut être expliqué par le fait que le pouvoir colonisateur des souches dépend de leur pouvoir compétitif vis-à-vis des microorganismes résidents de la rhizosphère et du rhizoplan de la tomate. Les souches bactériennes introduites ne colonisent les racines que si elles

arrivent à occuper les sites favorables (riches en exsudats racinaires) plus rapidement que la microflore naturelle (Digat, 1993). Une fois une partie des racines est occupée par les microorganismes indigènes, la bactérie introduite devient incapable de les déplacer (Suslow, 1982 ; Digat, 1993).

Conclusion

L'étude que nous avons menée nous a permis d'isoler 34 *Pseudomonas fluorescents* (P.F.) antagonistes à *C.m.m.*, agent causal du chancre bactérien de la tomate, à partir de la rhizosphère des plants de tomate sains localisés dans des parcelles fortement attaquées par cette bactériose. Ces antagonistes sélectionnés ont une zone d'inhibition dont le diamètre est compris entre 9 et 30mm. Les essais de colonisation réalisés ont permis la sélection de sept souches qui ont une très grande aptitude à coloniser les racines des plants de tomate.

Les souches qui forment notre collection (7 souches) sont d'une part des inhibiteurs de la croissance de *C.m.m.* "in vitro" et d'autre part des colonisateurs de la rhizosphère des plantules de tomate. Pour que ces souches puissent être utilisés comme agents de contrôle biologique contre *C.m.m.*, il est nécessaire de réaliser des tests "in vivo", sous serre et en plein champ pour évaluer la capacité de ces souches à protéger la tomate contre ce pathogène. Les *P. fluorescents* les plus efficaces "in vivo" seront par la suite identifiées et caractérisées.

Bibliographies

- Bahme J.B. and Schorth M.N. 1987. Spatial-temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potato. *Phytopathology* 77(7): 1093-1100.
- Barnett S.J., Singleton I. and Ryder M. 1999. Spatial variation in population of *Pseudomonas Corrugata* 2140 and *Pseudomonad* on take-all diseased and healthy root systems of wheat. *Soil biology and biochemistry* 31(1999): 633-636.
- Becker J.O. and Cook R.J. 1988. Role of siderophores in suppression of *Pythium species* and production of increased-growth of wheat by fluorescent *Pseudomonad*. *hytopathology* 78(6): 778-782.
- Calmel M. 1996. Etude de la colonisation de la rhizosphère du maïs par une souche de *Pseudomonas fluorescens*. Influence du mode d'inoculation. DEA I, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy. 43p.
- Chao W. L., Nelson E. B., Harman G. E. and Hoch H., C. 1986. Colonization of rhizosphere by biological control agents applied top seeds. *Phytopathology* 76(1): 60-65.

- Conway K. E., Foor C. J., Malvick D. and Bender C. 1989. Inhibition by *Pseudomonas cepacia*, a potential biocontrol agent, of selected soil borne pathogens; Phytopathology 79(10): 1159.
- Davis M. J., Gillaspie A. G., Vivadar A. K. and Haris R. W. 1984. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause Ratoon Stunting Disease of sugarcane and Bermuda grass stunting disease. Int. J. Syst. Bacteriol.:107-117.
- DeWeger L. A., VanAnrendonk J. J. C. M., Kees Recourt, Gerard A. J., Van Der Hofstad M., Weisbeek P. J. and Lugtenberg B. 1988. Siderophore-mediated uptake of Fe³⁺ by the plant growth-stimulating *Pseudomonas putida* strains WCS358 and other rhizosphere microorganisms. J. of bacteriology, oct, 1988: 4693-4698.
- Digat B., Expert J. M. et Bissis E. 1993. Ces bactéries qui protègent et stimulent les semences et les plantes ; PHH Revue horticole 341 : 16-21.
- Fatmi M., Eddaoudi M., Achbani E. et Colin J. 1984. Importance du *Corynebacterium michiganensis* pv. *michiganensis* dans la culture de la tomate au Maroc. Eléments d'épidémiologie. Hommes, terre et eau. 57 : 9-14.
- Fatmi M., Schaad N. W. and Bolkan H. A. 1991. Seed treatment for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from naturally infected tomato seeds. Plante disease 75(4): 383-385.
- Fuiki R., Poinar E. I., Schroth M. N., Hendson M., Wang X. L. and Hancock J.G. 1994. Spatial colonization patterns and interaction of bacteria on inoculated sugar beet seed. Phytopathology 84(11): 1338-1345.
- Gees R. et Coffey M. D. 1989. Evaluation of a strain of *Myrothycium roridum* as a potential biocontrol agent against *phytophthora cinnamomi*; Phytopathology 79(10): 1079-1084.
- Gitaits R. D. and Beaver R. W. and Voloudakis A. E. 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptom less tomato transplant. Plant disease 75(8): 834-838.
- Hofte M., Boelens J. and Verstraete W. 1992. Survival and root colonization of mutants of plant growth-promoting *Pseudomonads* affected in siderophore biosynthesis or regulation of siderophore production. Journal of plant nutrition 15(10): 2253-2262.
- Howell C. R. and Stipanovic R. D. 1980. Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotics, Pyoluteorin. Phytopathology 70(8): 712-715.
- Kloepper J. W., Leong J., Teintze M. and Schroth M. N. 1980. *Pseudomonas* siderophore: A mechanism explaining disease-suppressive soils. Current microbiology 4(1980): 317-320.
- Loper J. E. 1987. Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. Phytopathology 78(1): 166-171.
- Milus E. A., Rothrock C. S. and Rhoads M. L. 1991. Rhizosphere colonisation by selected soil bacteria and effects on growth and soil borne disease of wheat. Phytopathology 81(10) Abst: 1215.
- Pierson E. A. and Weller D. M. 1994. Use of mixture of *fluorescent pseudomonads* to suppress take-all and improve the growth of wheat. Phytopathology 84(9): 940-947.
- Strider D.L. 1967. Survival studies with tomato bacterial canker organism. Phytopathology 57: 1067-1071.
- Strider D. L. 1969. Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganensis*. A literature review and bibliography. North Carolina Agricultural Experiment Station. Tech. Bul. N°199. 110p.
- Suslow T. V. 1982. Role of Root-colonizing bacteria in plant growth. Phytopathogenic prokaryotes (1). M.S. Mount and G. Lacy, eds. Academic press, New york: 187-223.
- Susse T. 1998. Etude de la colonisation de la rhizosphère du maïs par une souche de *Pseudomonas fluorescens* en sol non stérile. Sélection d'un mutant résistant à la Rifampicine. Détection et quantification. DEA INPL, Nancy. 36p.
- Thomashow L. S. and Weller D. M. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Journal of microbiology 170(8): 3499-3508.
- Van peer R., Niemann C. J. and Schippers B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* Sp. Strain WCS417r. Phytopathology 81: 728-734.
- Weller D. M., howie W. J. and Cook R.J. 1988. Relationship between in vitro inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and suppression of take-all of wheat by *Fluorescent Pseudomonads*. Phytopathology 78(8): 1094-1100.
- Xu G. W. and Gross D. C. 1986. Field evaluation of the interaction among *fluorescent Pseudomonas*, *Erwinia carotova* and potato yields. Phytopathology 76: 423-430.
- Yuen Y., Schroth M. N. and Mecain A. H. 1985. Reduction of *Fusarium* wilt of carnation with suppressive soils and antagonistic bacteria. Plant disease 69(12): 1071-1075.

Annexe 7 : Curriculum Vitae

Prénom	: Nadiya
Nom	: Amkraz
Date de naissance	: 01/08/1975
Adresse	: Laboratoire de Biotechnologie et Valorisation des Ressources Naturelles Equipe de Phytopathologie et Lutte Intégrée Département de Biologie, Faculté des Sciences www.fsa.ac.ma Université Ibn Zohr BP 8106, 80000 Agadir, Maroc.
GSM / Fixe	: 06 67 09 54 45 / 05 28 30 86 88
Langues	: Arabe, Français et Anglais
E-mail	: amkrazn@yahoo.fr
Grade	: Surveillant Général au secondaire qualifiant (Lycée) [Ex-Professeur des SVT] et chercheur au LBVRN, Faculté des Sciences, Université Ibn Zohr Agadir, Maroc.
Divers	:- Membre de la Société Marocaine de Biochimie et Biologie Moléculaire (SMBBM) depuis 2006, de l'Association Marocaine de Biotechnologie Microbienne et de Protection des Ressources Naturelles depuis 2009 (MICROBIONA) et de l'Association التواصل النسائية du quartier Argana d'Ait Melloul depuis 2010 - Présidente du Club Environnement du Lycée Qualifiant El Bakkalli à Ait Melloul depuis Septembre 2012 - Ex-Présidente du Club de la Santé du Lycée Qualifiant AlMaarifa à Ait Melloul depuis Septembre 2010 - Prix de mérite (major de promotion) en 1997

DIPLOMES

<u>Baccalauréat</u>	1993 Bien
<u>Licence en Biologie générale</u>	1997 Bien
<u>Certificat de l'aptitude professionnelle à l'enseignement</u>	1999 Bien
<u>Diplôme des Etudes Supérieures Approfondies</u>	2000 Assez Bien
<u>De 2005 jusqu'au jour</u>	Préparation du Doctorat National

STAGES & FORMATIONS

- Formation pédagogique dans le cadre du programme de formation des nouveaux cadres de l'administration pédagogique du 25 Février au 02 Mars 2013 au Centre Zerktoni de Formation Continue d'Agadir. Thèmes :
 - Statistiques et planification scolaire
 - Gestion de l'absence dans les établissements scolaires
 - Méthodologie d'enseignement des matières au secondaire
- Formation pédagogique dans le cadre du programme de formation des nouveaux cadres de l'administration pédagogique du 11 au 16 Février 2013 au Centre Zerktoni de Formation Continue d'Agadir. Thèmes :
 - La communication
 - La coordination
 - Projet de l'établissement
- Formation pédagogique dans le cadre du programme de formation des nouveaux cadres de l'administration pédagogique du 24 au 29 Décembre 2012 au Centre Zerktoni de Formation Continue d'Agadir. Thèmes :
 - Gestion économiques et administrative des établissements scolaires
 - La carte scolaire
 - La vie scolaire active
- Formation pédagogique dans le cadre du programme Génie du 24 au 26 Octobre 2011 au Centre Régionale de Formation d'Inezegane.
- Formation pédagogique dans le cadre du programme Génie du 20 au 22 Décembre 2010 au Centre Régionale de Formation d'Inezegane.
- Formation pédagogique en didactique des SVT : la démarche scientifique et l'évaluation au secondaire qualifiant. Du 8 au 12 Novembre 2010 au Centre Pédagogique Régionale d'Inezegane.
- Stage de formation à la plateforme génomique fonctionnelle du Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique, Rabat, Maroc. Extraction de l'ADN/ARN bactérien et séquençage de l'ARN 16S des pseudomonas fluorescents. Blasts et élaboration des arbres phylogénétiques. Juillet 2010.
- Stage de formation à la plateforme Chimie Moléculaire du Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique, Rabat, Maroc. Caractérisation des huiles essentielles par GC/MS. Aout 2010.

- Formation en Géologie (Théorie, travaux pratiques et sortie) du 26 au 27 Mai 2009. Formation organisée par l'académie régionale de l'éducation et de la formation de la région de Souss-Massa Draa en faveur des professeurs des Sciences de la Vie et de la Terre de l'enseignement secondaire qualifiant.
- Formation en Nouvelle Technologies de l'Information et de Communication (NTIC) du 1 au 3 juillet 2008. Formation organisée par l'association des enseignants chercheurs de la faculté des Sciences d'Agadir. Création d'un site Web, Publipostage, Excel, Traitements des images avec le programme Image J et recherche bibliographique via les moteurs de recherche.
- Formation pédagogique portant sur l'enseignement par les compétences au secondaire qualifiant et la pédagogie de l'intégration. Du 26 au 28 Novembre 2007 au Centre Pédagogique Régionale d'Inezgane.
- Formation pratique en infographie (Photoshop et Illustrateur) organisée par l'Association des Etudiants Chercheurs de la Faculté des Sciences d'Agadir du 10 au 22 Février 2007 à la Faculté des Sciences d'Agadir.
- Stage de formation au laboratoire de Microbiologie du ministère de l'agriculture et de la pêche maritime. Méthodes d'identification des bactéries à l'aide des galeries API et des tests phénotypiques. Préparation et conservation des milieux de culture solides et liquides. Hygiène et entretien du Laboratoire de Microbiologie.
- Organisation d'une sortie pédagogique en faveur des élèves du tronc commun scientifique le 28 et 29 Avril 2006. Sortie écologique à la plage d'Anza et l'Arganeraie à côté de cette plage.
- Stage de formation au Laboratoire, Majdoubi d'Analyses de Biologie Médicale, Tiznit, Maroc. La durée du stage est de 1 mois et demi allant de Juillet à Aout 1997.

PUBLICATIONS

- Talibi I, **Amkraz N**, Msanda F, Boudyach EH, Boubaker H, Bouizgarne B, Ait Ben Aoumar A (2011). Antibacterial activity of Moroccan plants extracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomatoes' bacterial canker. J. of Medicinal P. Res. 5 (17): 4332-4338.
- **Amkraz N.**; Boudyach E. H.; Boubaker H.; Bouizgarne B.; Ait Ben Aoumar A. (2010). Screening for fluorescent *Pseudomonads*, isolated from the rhizosphere of

tomato plants, for antagonistic activity towards *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. World J. Microbiol. Biotechnol. 26 (6): 1059-1065. DOI 10.1007/s11274-009-0270-5.

- **Amkraz N.**; Boudyach E. H.; Boubaker H.; Ait Ben Aoumar A. (2006). Isolement, triage et sélection des *Pseudomonas* fluorescents et évaluation de leur effet protecteur vis-à-vis du chancre bactérien de la tomate. In Actes du 2^{ème} Congrès International de Biochimie. Agadir, 09-12 Mai 2006. Biochimie, substances naturelles et environnement : 347-351.
- **Amkraz N.**, Boubaker H., Bouizgarne B., Boudyach E.H. and Ait Benaoumar A. (2013). Molecular identification of some fluorescents *Pseudomonas* associated with antibacterial activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (à Soumettre pour publication).
- **Amkraz N.**, Talibi I., Boubaker H., Bouizgarne B., Msanda F., Boudyach E.H. and Ait Benaoumar A. (2013). Antioxidant activity, phenols and flavonoids contents of some Moroccan medicinal plants associated with antibacterial activity in tomato. (À soumettre pour publication).

ACTIVITES SCIENTIFIQUES

- Organisation et participation aux journées printanière du Lycée Al Bakkalli qualifiant du Jeudi 02 au Samedi 04 Mai 2012 sous le thème « Les clubs éducatifs : des espaces pour la consolidation du comportement civile ».
- Organisation de la semaine de la santé au Lycée Al Maarifa qualifiant du Lundi 7 au Samedi 12 Mai 2012 sous le thème « Ma santé le trésor de ma vie ».
- Participation à l'Assemblée Générale de la SMBBM qui a eu lieu le Mardi 27 Mars 2007 à la Faculté des Sciences Ben M'Sik, Université Hassan II, Casablanca.
- Participation aux journées scientifiques et artistiques du Lycée Qualifiant Abou Alaabasse Assabti sous le thème : La Réponse Immunitaire. Complexe Artistique et culturel de Bensergaou, Agadir, Maroc 29-30 Mai 2006.
- Organisation d'une conférence scientifique sur les Biotechnologies au profit des élèves du lycée Qualifiant AL Maarifa. Conférence animée par le Professeur AbdelHamide Elmoussadek dans le cadre de la quatrième édition de la semaine

Nationale de la Science organisée par la faculté des Sciences d'Agadir au sein du Lycée.

- Participation aux travaux de la quatrième édition de la semaine Nationale de la Science. Faculté des Sciences Agadir, Maroc, Avril 2006.
- Participation aux Journées Portes ouvertes « Sensibilisation et valorisation du patrimoine Scientifique » organisées par l'Association des Etudiants Chercheurs de la Faculté des Science d'Agadir AECFSA le 17 et 18 Février 2006 à la Faculté des Sciences d'Agadir.
- Roundtable Session of Young Professional's Platform for Agricultural Research for Development (YPARD) entitled "How to increase young people involvement in Agricultural Research for Development (ARD)?", held during the Consultative Group on International Agricultural Research (CGIAR) Annual General Meeting on December 4, 2005 in INRA Menara Research Station, Marrakech, Morocco.