

ÉVALUATION DU POTENTIEL DE SOUCHES ANTAGONISTES DE *BACILLUS* SPP. ET DE *PSEUDOMONAS* SPP. DANS LE CONTRÔLE D'*AGROBACTERIUM* SPP. PATHOGÈNES IMPLIQUÉS DANS LA MALADIE DE LA GALLE DU COLLET

DJELLOUT Hafidha^{1*}, MEKHELDI Delel¹, BELKACEM KOUMRI Khayra¹, RAIO Aida² et KRIMI Zoulikha¹

1. Université Saad Dahlab Blida 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département des Biotechnologies, Laboratoire de Valorisation des Ressources Agrobiologiques, B.P. 270, route de Soumaa, Blida, Algérie

2. Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante CNR, Via Madonna del Piano, 10, 50019 Sesto Fiorentino (FI) Italy.

Reçu le 22/05/2019, Révisé le 08/06/2019, Accepté le 25/06/2019

Résumé

Description du sujet : Les bactéries antagonistes contribuent à la gestion des maladies des plantes en stimulant les défenses naturelles chez l'hôte et/ou en assurant le biocontrôle direct des bioagresseurs.

Objectifs : Étude du pouvoir antagoniste *in vitro* et *in planta* et la suppression de l'effet nécrotique *in vivo* de quatre souches préalablement identifiées appartenant aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* à l'égard de deux souches d'*Agrobacterium tumefaciens* et deux souches d'*Agrobacterium vitis*.

Méthodes : Le pouvoir antagoniste *in vitro* a été évalué par la technique de spots, en utilisant deux techniques de confrontation. La suppression *in vivo* de l'effet nécrotique des souches d'*A. vitis* a été effectuée sur les rameaux verts de quatre variétés de vigne. L'antagonisme *in planta* a été réalisé sur des plantules de tomate et de vigne cultivées en serre.

Résultats : Les souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* utilisées se sont montrées très actives *in vitro*, conduisant à une réduction ou une suppression des effets nécrotiques des souches pathogènes d'*A. vitis* et une diminution du développement des symptômes de la galle du collet *in planta*.

Conclusion : Ces résultats sont intéressants et suggèrent une utilisation prometteuse de ces souches antagonistes dans le biocontrôle de la galle du collet.

Mots clés : Antagonisme ; *Agrobacterium* ; pathogène, biocontrôle ; nécrose ; tumeur.

POTENTIAL EVALUATION OF ANTAGONISTIC *BACILLUS* SPP. AND *PSEUDOMONAS* SPP. TO CONTROL PATHOGENIC *AGROBACTERIUM* SPP. INVOLVED IN CROWN GALL DISEASES

Abstract

Description of the subject: Antagonistic bacteria contribute to the management of plant diseases by stimulating the host's natural defenses and/or by providing direct biocontrol of pests.

Objective: Study of *in vitro* and *in planta* antagonistic capacity and *in vivo* suppression of necrotic effects by using four strains belonging to the genera *Bacillus* and *Pseudomonas* against two strains of *Agrobacterium tumefaciens* and two strains of *Agrobacterium vitis*.

Methods: *In vitro* antagonistic capacity was evaluated by the spot technique using two confrontation techniques. *In vivo* suppression of the necrotic effect of *A. vitis* strains was carried out on green shoots of four grapevine varieties and *in planta* antagonism test was performed on tomato and grapevine seedlings.

Results: *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. strains were very active *in vitro*, leading to a reduction and suppression of the necrotic effects of *A. vitis* strains and a decrease in the development of symptoms of the disease *in planta*.

Conclusion: These results are interesting and suggest a promising use of these antagonistic strains in biocontrol of crown gall.

Keywords: Antagonism; *Agrobacterium*; pathogenic; biocontrol; necrosis; tumor.

* Auteur correspondant : DJELLOUT Hafidha, E-mail:rahmdjellout-hafidha@outlook.fr

INTRODUCTION

La galle du collet constitue une grave maladie bactérienne qui peut engendrer des pertes économiques considérables pouvant aller jusqu'à 70% de la totalité de la production [1]. Elle est causée par plusieurs espèces d'*Agrobacterium* spp., qui constituent de dangereux parasites des végétaux et des cultures, car, une fois les plantes infectées, aucune pratique de lutte n'est efficace. Les bactéries responsables de cette maladie sont principalement ; *Agrobacterium vitis* et *Agrobacterium tumefaciens*. Ces deux bactéries provoquent la maladie du crown gall qui se manifeste par des tumeurs au niveau des racines et du collet des plantes. Dans le cas de la vigne, en plus des tumeurs sur les sarments et au collet, une nécrose racinaire apparente, constitue un symptôme supplémentaire aggravant l'infection. En Algérie, cette maladie a été révélée présente sur de nombreuses espèces cultivées en pépinière [2 ; 3], notamment sur des boutures de vigne en dormance. Sur la vigne, *Agrobacterium vitis* affecte la croissance et rend les plants très sensibles aux conditions environnementales comme le gel en période hivernale [1].

La prophylaxie est le seul moyen pour prévenir l'installation de cette maladie. L'utilisation des agents microbiens de lutte biologique constitue une approche écologique très prometteuse. Les microorganismes antagonistes colonisent les tissus de la plante et ont été décrits par ailleurs, comme stimulateurs de croissance sur l'hôte [4]. Ces souches antagonistes peuvent être facilement appliqués dans les pratiques des pépinières par l'immersion des racines des jeunes plants et boutures dans les inoculas bactériens avant la plantation [1].

Certaines souches bactériennes ont montré leurs effets protecteurs envers une large gamme de microorganismes phytopathogènes. Le cas le plus largement rapporté est celui de la souche *Agrobacterium radiobacter* K84 qui agit en induisant une inhibition de la formation des tumeurs chez plusieurs végétaux infectés par des souches tumorigènes d'*Agrobacterium* par production de l'agrocine 84 [5]. L'inefficacité de cette bactériocine vis-à-vis de plusieurs souches d'*Agrobacterium* a mené plusieurs études à rechercher de nouvelles souches antagonistes ayant le pouvoir de supprimer les dégâts causés par cette bactérie phytopathogène [6].

Deux genres bactériens telluriques et endophytiques *Bacillus* et *Pseudomonas* comprennent la majorité des bactéries utilisées comme antagonistes [7]. Ils sont connus par leur diversité de mécanismes d'action et de métabolites impliqués dans la protection des végétaux face aux différentes maladies [8]. De plus, les *Bacillus* offrent un avantage par rapport aux autres bactéries, en raison de leur capacité à former des endospores résistantes au changement des conditions du milieu offrant ainsi un avantage pour la formulation du produit [9, 10].

L'objectif de cette étude consiste à évaluer le pouvoir antagoniste *in vitro* et *in planta* et la suppression de l'effet nécrotique *in vivo* de quatre bactéries appartenant à deux genres *Bacillus* et *Pseudomonas*, initialement isolées de plantes spontanées [11], vis-à-vis de deux souches pathogènes d'*A. vitis* et de deux souches d'*A. tumefaciens*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Souches bactériennes utilisées

Deux souches de *Pseudomonas brassicacearum* (CR2 et EPR3), la souche OS1 de *Bacillus cereus* et la souche OS4 de *Bacillus methylotrophicus* ont été isolées initialement à partir des plantes spontanées et identifiées par séquençage de l'ADN ribosomal 16S Krimi et al. [11]. Ces souches ont été sélectionnées sur la base de leur pouvoir antagoniste *in vitro* et de leur activité de stimulation de la croissance des plantes [11]. Les souches pathogènes d'*A. tumefaciens* dont ; une de référence C58 et une locale E2 isolée d'eucalyptus [3] ont servi pour les tests *in vitro* et *in planta*. Deux autres souches d'*A. vitis* (AV25/95 et Bu20/95) gracieusement fournies par Marylin L. Canfield, Department of Botany and Plant Pathology, Oregon State University, Corvallis, Oregon, ont subi les mêmes tests que les précédentes. Toutes les souches d'*Agrobacterium* appartiennent à la collection de bactéries phytopathogènes de l'Université de Blida1 et ont fait l'objet de tests préliminaires de pathogénicité sur *Kalanchoë daigremantiana* et *Lycopersicum esculentum* [12].

2. Test d'antagonisme *in vitro*

Le pouvoir antagoniste des souches de *Pseudomonas* et de *Bacillus* à l'égard des souches d'*Agrobacterium* pathogènes a été testé *in vitro* par deux techniques de confrontations :

- la première consiste à laisser un laps de temps (24 h) qui permet à la souche antagoniste de diffuser les molécules antimicrobiennes dans le milieu de culture avant le dépôt de la souche pathogène ; c'est la confrontation déphasée.
- La deuxième technique de confrontation simultanée, consiste à déposer les deux souches, antagoniste et pathogène en même temps.

2.1. La confrontation déphasée

La confrontation déphasée *in vitro* a été réalisée suivant la méthode décrite par Stonier [13] et modifiée par Moore *et al.* [12]. Les bactéries de *Pseudomonas* spp. et de *Bacillus* spp. à tester, ont été cultivées sur le milieu LPGA pendant 48 h à 28°C. Chaque souche bactérienne purifiée a été raclée des boîtes de Pétri contenant le milieu LPGA et mise en suspension dans l'eau distillée stérile (EDS) à une concentration connue (10^6 UFC/mL), déterminée par spectrophotométrie en comparant la DO de chaque suspension à sa propre courbe de croissance de référence à $\lambda=600$ nm. Un volume de 20 μ L de chaque suspension bactérienne a été ensemencé sous forme d'un spot central sur la surface des boîtes du milieu LPGA qui ont été incubées par la suite pendant 24 h à 28°C. En même temps, les bactéries pathogènes ont été ensemencées sur le milieu LPGA et cultivées dans les mêmes conditions décrites que les antagonistes. Après incubation, les suspensions de bactéries pathogènes (10^6 UFC/mL) préparées comme décrit ci-dessus, sont pulvérisées à l'aide d'un aérosol sur la surface des boîtes de Pétri contenant les souches bactériennes ensemencées auparavant en spot. Les boîtes de Pétri ont été incubées de nouveau pendant 48 h à 28°C et l'apparition d'une zone d'inhibition entourant la macro-colonie a été considérée comme une activité antagoniste positive. L'efficacité d'inhibition relative des différentes souches a été évaluée par la mesure du diamètre de chaque colonie en plus de la zone d'inhibition. L'expérience a été réalisée avec trois répétitions pour chaque souche.

2.2. La confrontation simultanée

La confrontation simultanée consiste à déposer les deux souches, antagoniste et pathogène en même temps. Pour réaliser ce type de confrontation, nous avons suivi le principe de la méthode des puits à double couche décrite par Rhouma *et al.* [14].

Des boîtes de Pétri sont coulées avec une couche solide du milieu LPGA, juste après la solidification de cette couche, une autre couche semi-solide du même milieu est coulée de nouveau sur la première. A l'aide d'un emporte-pièce stérile, trois puits de 0.8 mm de diamètre sont creusés sur la couche semi-solide ; ils correspondent par conséquent, à 3 répétitions par boîte et par souche. Ces boîtes de Pétri sont pulvérisées par la suspension de la souche pathogène d'*Agrobacterium* à une DO de 10^6 CFU/mL. Après pulvérisation, un volume de 20 μ L de la suspension de la bactérie supposée antagoniste est déposé dans chaque puits. Enfin, les boîtes sont incubées à 28°C pendant 48 h. Pour les témoins, nous avons pulvérisé le pathogène puis déposé de l'EDS dans les trois puits. L'apparition d'une zone d'inhibition claire entourant des puits a été considérée comme une activité antagoniste positive. Les résultats obtenus ont été enregistrés en mesurant le diamètre en mm des zones d'inhibition.

3. Essai *in vivo* de la suppression de l'effet nécrotique d'*Agrobacterium vitis* par l'utilisation des souches antagonistes

L'infection par les souches pathogènes d'*A. vitis* se manifeste principalement par la formation d'une tumeur au niveau du point d'inoculation et des nécroses au niveau des racines sur la vigne infectée [15,16]. Les quatre souches antagonistes sont testées pour examiner leurs capacités ou non à supprimer l'effet nécrotique des souches pathogènes d'*A. vitis* (AV20/95 et Bu25/95), cet essai a été réalisé en suivant la méthode décrite par Burr et Zheng [17]. Le matériel végétal est constitué de rameaux verts de vigne (*Vitis vinifera*) fraîchement cueillis présentant un diamètre entre 5 et 10 mm. Quatre variétés de vigne ont été testées : Gros noir, Cinsault, Muscat et la variété Ahmer Bouamer. Dans des conditions d'asepsie, la désinfection superficielle des rameaux verts des différentes variétés de vigne avant leur découpe a été faite dans de l'éthanol à 70 % pendant 2 min et dans l'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 0,5% pendant 10 min suivie de trois rinçages successifs à l'EDS. Les rameaux séchés sur du papier Wattman stérile sont découpés en sections cylindriques de 1 cm de longueur. Dans des microplaques de culture cellulaire à 12 alvéoles contenant une couche d'eau gélosée à 2 %, nous avons placé les sections de chaque variété en tenant l'extrémité basale de chaque section vers le haut.

Après fixation des sections sur le milieu gélosé, un volume de 10 µL de la suspension de la souche antagoniste et/ou de la souche

d'*A. vitis* (selon le traitement – tableau 1) est déposé.

Tableau 1 : Les différents traitements de l'essai *in vivo*.

Traitements	
T1	témoin négatif qui consiste à déposer de l'eau distillée stérile sur les sections de la vigne de chaque variété.
T2	témoin positif représenté par les sections de la vigne de chaque variété inoculée par la suspension de la souche pathogène d' <i>A. vitis</i> (soit AV25/95 ou Bu20/95).
T3	les sections de la vigne de chaque variété inoculées directement avec la suspension de souches antagonistes: EPR3, CR2, OS1 et OS4.
T4	Le traitement consiste à interagir le pathogène avec l'antagoniste en laissant un laps de temps de 20 min entre le dépôt de l'antagoniste et l'inoculation du pathogène.

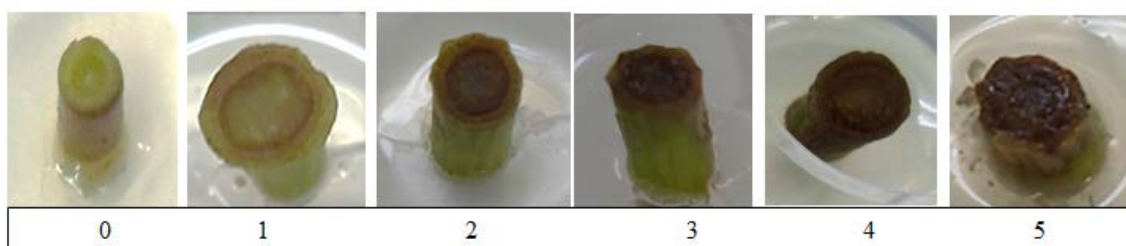
L'essai de suppression de l'effet nécrotique *in vivo* a été réalisé sur des microplaques de culture à 12 alvéoles selon un dispositif expérimental qui comporte plusieurs traitements. Une section cylindrique des rameaux verts de chaque variété avec trois répétitions pour chaque traitement, soit un total de 48 sections. Au total, pour tous les traitements de l'essai *in vivo*, nous avons utilisé 192 sections de rameaux. Pour la concentration cellulaire, nous avons appliqué le ratio 10:1 où la concentration de l'antagoniste est 10 fois supérieure à la concentration de la souche pathogène. La DO de la suspension de l'antagoniste a été ajustée à 0,22, elle correspond à une concentration de 10⁷ CFU/mL. La concentration de la souche pathogène correspond à 10⁶ CFU/mL (DO=0,12). Les microplaques sont ensuite recouvertes avec du papier aluminium et placées à la température ambiante du

laboratoire pendant sept jours. Si la souche antagoniste possède une action inhibitrice de l'effet nécrotique vis-à-vis des souches pathogènes d'*A. vitis*, les sections des rameaux verts de la vigne vont garder une couleur plus ou moins verte par rapport aux témoins positifs inoculés par la souche pathogène qui noircisse. La sévérité de l'effet nécrotique au niveau des sections des rameaux verts est évaluée selon l'échelle de classe de 0 à 5 décrit par Oslane *et al.* [18] suivant le tableau 2. Les sections de rameaux verts de chaque variété testée ont été classées selon 5 classes de sévérité, puis l'indice de sévérité (IS%) a été calculé selon la formule suivante [19] :

IS% = $(\sum (N_i \times S_i) / (N_t \times 5)) \times 100$. Ni : Nombre de sections de rameaux dans la classe de sévérité i, i allant de 1 à 5. Si : Numéro de classe de sévérité. Nt : Nombre total de sections observées par traitement.

Tableau 2 : Echelle d'estimation de la sévérité de l'effet nécrotique.

Classe de sévérité	Degré d'infection des sections des rameaux verts de la vigne
0	Pas d'effet nécrotique
1	Très peu nécrosé (passage du vert à une couleur sombre)
2	Peu nécrosé (brunissement)
3	Nécrosé (noircissement)
4	Plus nécrosé
5	La section de la vigne est totalement nécrosée (pourriture).



4. Essai d'antagonisme *in planta*

Le test d'antagonisme *in planta* a été mené sur des plants de tomate et de vigne. Le choix de tester l'activité antagoniste sur la tomate (*Lycopersicon esculentum*), est dû au fait qu'elle constitue une plante hôte utilisée lors des expérimentations pour les bactéries pathogènes d'*Agrobacterium*, car en cas de réponse positive, elle développe des tumeurs en un temps très court [20]. La variété testée est Saint Pierre (var. fixe). Pour la vigne (*Vitis vinifera*), elle constitue la principale plante hôte d'*A. vitis* [21]. La variété utilisée dans ce test d'antagonisme *in planta* est le Gros noir, les graines ont été récupérées en décembre 2012 à partir de grappes d'un vignoble situé à Bouchrahil (W. Médéa).

4.1. Méthodologie

Les semences de tomate et les graines de raisin ont été désinfectées dans une solution constituée de NaOCl à 2 % pendant 5 min, puis rincées à l'EDS. Les graines de raisin désinfectées, ont subi une pré-germination dans des boîtes de Pétri contenant une couche d'eau gélosée à 7% et mises dans un incubateur à 28 °C afin d'accélérer leur germination. Les plants de tomate et de vigne ont été cultivés sur un substrat composé d'un mélange de 2/3 de terre végétale et 1/3 de tourbe, soigneusement homogénéisés et autoclavés deux fois pendant 60 min à 120 °C,

avec un intervalle de 24 h entre chaque autoclavage. Le semis des graines de tomate et de la vigne pré-germées a été réalisé dans des pots (10 cm × 6,5 cm) en mini-serre, avec une photopériode quotidienne de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité à une température de 25±1°C. Au cours de l'expérience, un niveau adéquat d'humidité du substrat a été maintenu par une irrigation régulière. La sélection des plantules germées est faite après la germination des semences de tomate et de la vigne et avant leur inoculation par les bactéries antagonistes. Les plantes de tomates ont été choisies au stade de deux vraies feuilles pour que l'ensemble des plantes soit homogène et de même stade phénologique. Alors que pour les plants de la vigne, le choix des individus avait porté sur les plants ayant un diamètre qui oscille entre 5 et 10 mm avant l'inoculation et ce, dans l'objectif d'avoir une moindre hétérogénéité entre les plants testés. L'essai de l'antagonisme *in planta* a été réalisé sous serre selon un dispositif expérimental, en blocs complets avec plusieurs traitements (Tableau 3). Pour la tomate, six répétitions pour chaque traitement. Au total, pour tous les traitements de l'essai d'antagonisme sur la tomate, 90 plants ont été utilisés pour l'analyse pour chaque technique de confrontation (déphasée et simultanée). Pour la vigne, nous avons appliqué le même type de dispositif avec quatre répétitions pour chaque traitement, soit un total de 60 plants (pour chaque type de confrontation).

Tableau 3 : Les différents traitements de l'essai *in planta*.

Traitements	
T1	témoin négatif représenté par les plants inoculés avec l'eau distillée stérile.
T2	témoin positif représenté par le trempage des plants dans la suspension bactérienne d'antagoniste puis inoculation par blessure par les souches tumorigènes d' <i>Agrobacterium</i> (C58, E2, Bu20/95 et AV25/95).
T3	trempage des plants directement dans la suspension des souches antagonistes: EPR3, CR2, OS1 et OS4.
T4	inoculation par blessure des plantules avec les suspensions des souches tumorigènes d' <i>Agrobacterium</i> (C58, E2, Bu20/95 et AV25/95).

4.2. Techniques d'inoculation des plantules de tomate et de la vigne

4.2.1. Confrontation déphasée *in planta*

Les plantules de tomate et de vigne sont dépotées, rincées pour éliminer l'excès du sol puis trempées pendant 24 h dans la suspension de la bactérie sélectionnée à une densité cellulaire de 10⁶ CFU/mL [22]. Les plantules de tomate et de vigne traitées par l'antagoniste

seront par la suite inoculées par les souches pathogènes d'*Agrobacterium* (C58, E2, Bu20/95 et AV25/95) à une concentration cellulaire de 10⁶ CFU/mL. Le témoin négatif correspond à des plantes trempées dans l'EDS. Après 24 h, les plantes trempées sont re-transplantées dans leurs pots. Avec un scalpel stérile, on réalise trois blessures sur la tige de chaque plantule de tomate, à intervalle de 1 cm à partir de l'extrémité en croissance. Pour les

plantules de la vigne, nous avons réalisé deux blessures sur le rameau, la première au niveau du collet et la seconde située au niveau du premier entre-nœud. Un volume de 0,5 mL d'EDS ou de la suspension bactérienne de l'agent pathogène (selon le traitement) est introduit au niveau des blessures. La tige inoculée est ensuite enveloppée avec du papier aluminium stérile afin d'éviter la dessiccation de l'inoculum. Les plantules sont maintenues en serre à une température de 25 à 28°C, puis inspectées pour le développement des tumeurs.

4.2.2. Confrontation simultanée in planta

Le même protocole est suivi lors de la réalisation de la confrontation simultanée *in planta*, les plantules de tomate et de vigne sont trempées pour quelques secondes dans l'EDS ou dans la suspension de l'antagoniste (selon le traitement) puis immédiatement inoculées avec l'agent pathogène.

4.3. Evaluation du potentiel de biocontrôle de la maladie de la galle du collet pour l'essai d'antagonisme in planta

L'infection par les bactéries tumorigènes d'*Agrobacterium* se manifeste principalement par la formation d'une tumeur au niveau du point d'inoculation [21, 23]. L'efficacité des antagonistes bactériens dans la réduction du développement tumoral a été évaluée en enregistrant la taille des tumeurs, sept semaines après inoculation par le pathogène pour les plantules de vigne et neuf semaines pour les plantules de tomate.

5. Analyse statistique

L'activité antagoniste *in vitro* des souches antagonistes envers les souches pathogènes d'*Agrobacterium* est indiquée par des zones d'inhibition de croissance autour des spots et des puits des bactéries antagonistes. Un calcul de la moyenne des diamètres de la zone d'inhibition a été effectué. Les résultats obtenus pour le test *in vivo* de suppression de l'effet nécrotique d'*A. vitis* par l'utilisation des souches antagonistes et le test d'antagonisme *in planta*, ont été analysés par le logiciel statistique Systat (vers. 12). Nous avons analysé les conditions paramétriques considérées : les souches antagonistes, les souches d'*A. vitis*, et l'indice de sévérité de l'effet nécrotique (IS%). Le test ANOVA est effectué et la distribution de la variable quantitative doit être normale. Les résultats du test d'antagonisme *in planta* des souches antagonistes envers les souches d'*Agrobacterium*, ont été aussi analysés en

tenant compte de toutes les conditions paramétriques qui sont : les souches antagonistes, les souches d'*Agrobacterium*, la variation dans le temps, la variation de la position des tumeurs et la taille des tumeurs. Le test ANOVA est effectué et parallèlement, distribution de la variable quantitative à analyser doit être normale.

RESULTATS

1. Pouvoir antagoniste in vitro des souches de *Pseudomonas* et de *Bacillus*

Les bactéries des genres *Pseudomonas* et *Bacillus* utilisées, ont montré une activité antagoniste vis-à-vis des souches d'*A. vitis* et d'*A. tumefaciens*. Les différentes souches antagonistes présentent un effet inhibiteur variable selon la souche pathogène d'*Agrobacterium* et selon le temps entre le dépôt de l'antagoniste et celui du pathogène (selon la technique de confrontation : simultanée ou déphasée).

Les quatre souches testées ont montré un effet antagoniste envers les quatre souches pathogènes d'*Agrobacterium* utilisés, les diamètres des zones d'inhibition varient de 21 à 50 mm. La souche d'*A. vitis* Bu20/95 a été la moins sensible avec des zones d'inhibition ne dépassant pas 22 mm sous l'effet des trois souches CR2, OS1 et OS4 par rapport à la souche AV25/95 et les autres souches d'*A. tumefaciens*. La souche CR2 a montré un effet antagoniste très important envers la souche AV25/95 avec un diamètre de zone d'inhibition de 39,33 mm, suivie par *B. methylotrophicus* OS4 avec 37,67 mm. La souche de *Pseudomonas* EPR3 a généré des zones d'inhibition de 50 mm à l'égard d'*A. tumefaciens* C58 (Tableau 4).

Tableau 4 : Moyenne des zones d'inhibition (mm) pour la confrontation déphasée *in vitro* des quatre bactéries antagonistes envers les souches pathogènes d'*Agrobacterium*.

Souches antagonistes	AV25/95	Bu20/95	C58	E2
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> CR2	39,33	22,33	27,67	35,00
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> EPR3	30,67	31,33	51,00	35,67
<i>Bacillus cereus</i> souche OS1	25,33	21,00	31,00	30,67
<i>Bacillus methylotrophicus</i> OS4	37,67	20,67	36,00	30,00

Pour la confrontation simultanée, le dépôt de l'antagoniste en même temps que le pathogène n'a pas empêché certaines souches à exprimer leur pouvoir inhibiteur.

La souche EPR3 de *P. brassicacearum* a enregistré une zone d'inhibition de 40 mm envers la souche d'*A. tumefaciens* C58, suivie par la souche de *B. methylotrophicus* OS4 qui a aussi montré une moyenne de zone d'inhibition de 34 mm avec la souche d'*A. vitis* AV25/95. Cependant, les deux souches CR2 et OS1 n'ont montré aucun effet antagoniste envers Bu20/95 avec absence totale de la zone d'inhibition (Tableau 5).

Tableau 5 : Moyenne des zones d'inhibition (mm) pour la confrontation simultanée *in vitro* des quatre bactéries antagonistes envers les souches pathogènes d'*Agrobacterium*.

Souches antagonistes	AV25/95	Bu20/95	C58	E2
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> CR2	28,00	00,00	24,00	31,33
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> EPR3	28,00	20,67	40,00	20,00
<i>Bacillus cereus</i> OS1	20,67	00,00	22,00	20,33
<i>Bacillus methylotrophicus</i> OS4	34,00	21,00	23,00	26,00

En général, la confrontation déphasée (24 h) a montré une activité antagoniste plus importante des souches de *Pseudomonas* et de *Bacillus* comparée à la confrontation de type simultanée (0 h) (Fig. 1).

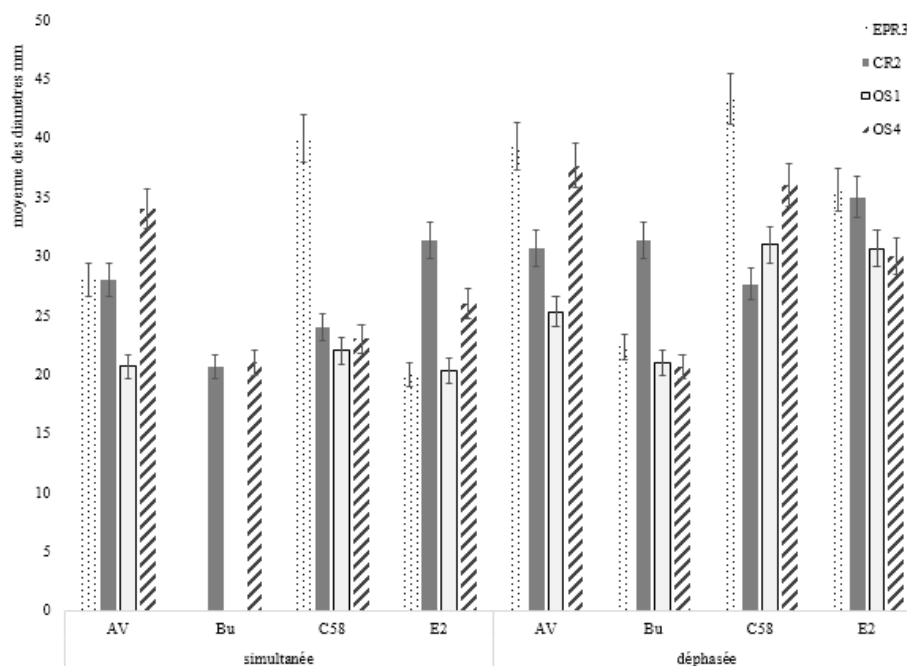


Figure 1 : Comparaison de l'inhibition *in vitro* pour les deux techniques de confrontation. (AV ; Bu ; E2 ; C58 : les bactéries pathogènes) (EPR3 ; CR2 ; OS1 ; OS4 : les bactéries antagonistes)

Les résultats obtenus pour les deux techniques de confrontation déphasée et simultanée montrent que l'écartement de temps attribué aux souches de *Bacillus* et *Pseudomonas* a influencé la capacité de ces souches à inhiber la croissance des pathogènes *in vitro* (Fig. 2).

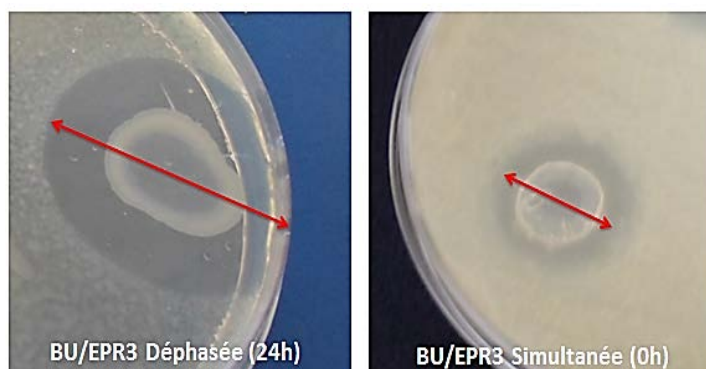


Figure 2 : Pouvoir antagoniste de *P. brassicacearum* souche EPR3 pour les deux techniques de confrontation *in vitro*.

↔ Diamètre de la zone d'inhibition. Bu : la souche Bu20/95 d'*A. vitis*.

2. Test *in vivo* de la suppression de l'effet nécrotique des souches d'*A. vitis* sous l'effet des souches antagonistes

Sept jours après l'incubation, des nécroses de teinte variables se sont développées sur les sections des rameaux verts des quatre variétés de vigne. Les variétés Gros noir et Ahmer

Bouamer semblent plus sensibles à l'effet nécrotique des deux souches d'*A. vitis* tandis que les variétés Muscat et Cinsault montrent des nécroses moins évidentes. Les nécroses sont apparues sur la partie basale des sections des rameaux verts de la vigne en manifestant une couleur variant du brun au noir (Fig. 3).

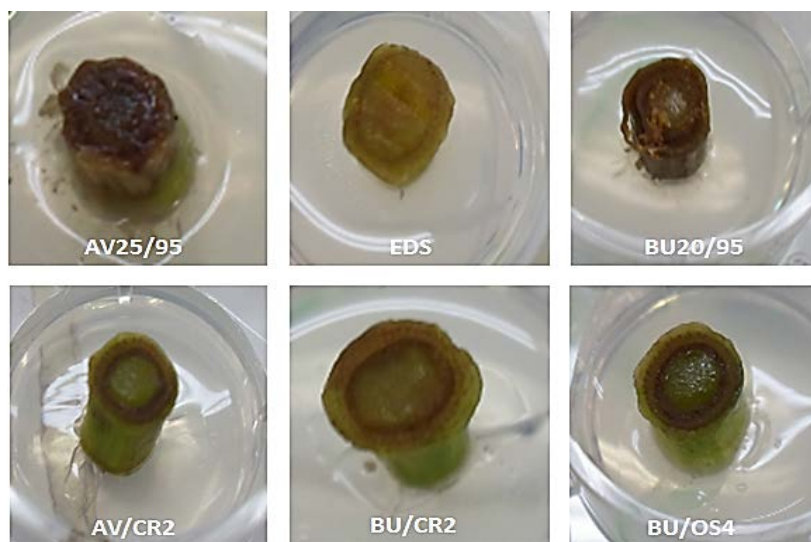


Figure 3 : Suppression ou réduction de l'effet nécrotique des souches pathogènes d'*A. vitis* par les souches antagonistes sur la variété Muscat 7 jours après incubation.

(AV25/95 ; Bu20/95 : les bactéries pathogènes d'*A. vitis*) (EDS : eau distillé stérile ; OS4 ; CR2 : les bactéries antagonistes)

La souche AV25/95 d'*A. vitis* s'est montrée plus virulente que la souche Bu20/95 en exprimant un indice de sévérité de l'effet nécrotique plus important sur les sections de la vigne. Les sections inoculées par cette souche ont développé des nécroses plus sévères que celles développées sur les sections inoculées par la souche Bu20/95, ce résultat a été observé sur toutes les variétés (Fig. 4).

Nous avons remarqué une variabilité dans l'apparition des nécroses causées par les pathogènes sur les quatre variétés (Fig. 4). La variété Gros noir s'est révélée la plus

sensible à l'effet nécrotique suivie par Ahmer Bouamer, l'indice de sévérité de l'effet nécrotique plus accentuées apparaît évident sur les sections des rameaux verts. Les variétés Cinsault et Muscat sont apparues moins sensibles en montrant un indice de sévérité de l'effet nécrotique moins développé par rapport aux deux autres variétés et en comparaison avec les témoins positifs inoculés directement avec les suspensions des souches d'*A. vitis*.

Les souches antagonistes ont montré un effet protecteur très important en supprimant ou/et en réduisant la sévérité de la nécrose en comparaison avec le témoin positif traité directement par la souche pathogène. Le traitement avec les souches antagonistes a montré un effet suppresseur de l'effet nécrotique causé par le pathogène (Fig. 5). La souche CR2 de *P. brassicacearum* a été la plus efficace en supprimant l'effet nécrotique des deux souches pathogènes sur les sections traitées des variétés Cinsault, Gros noir et Ahmer Bouamer. Sur la variété Muscat, la

souche la plus efficace était OS1 de *B. cereus* où une inhibition totale a empêché les deux souches d'*A. vitis* à exprimer leur pouvoir nécrotique sur les sections des rameaux qui sont restées vertes. Les sections de la vigne inoculées directement par les souches antagonistes de *Bacillus* spp. et de *Pseudomonas* spp. ont causé des nécroses très légères (brunissement) en comparaison avec les sections traitées avec l'EDS. L'indice de sévérité de l'effet nécrotique n'a pas dépassé 40%.

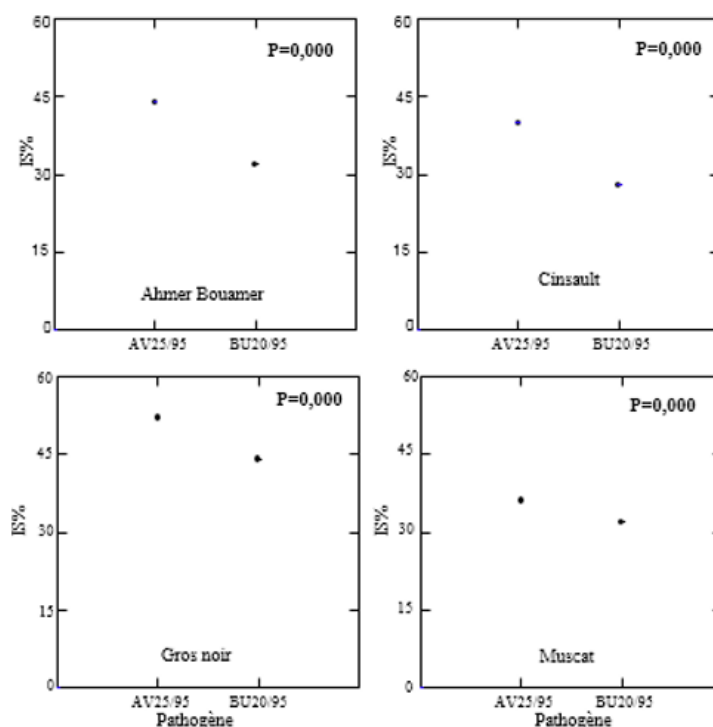


Figure 4 : Relation entre l'indice de sévérité et le pouvoir nécrotique *in vivo* des souches d'*A. vitis* sur les quatre variétés de vigne testées.

(IS% : indice de sévérité ; AV25/95 ; Bu20/95 : les bactéries pathogènes d'*A. vitis*) (CR2 ; EPR3 ; OS4 ; OS1 : les bactéries antagonistes) (Gros noir ; Cinsault ; Muscat ; Ahmer Bouamer : les variétés de vigne utilisées)

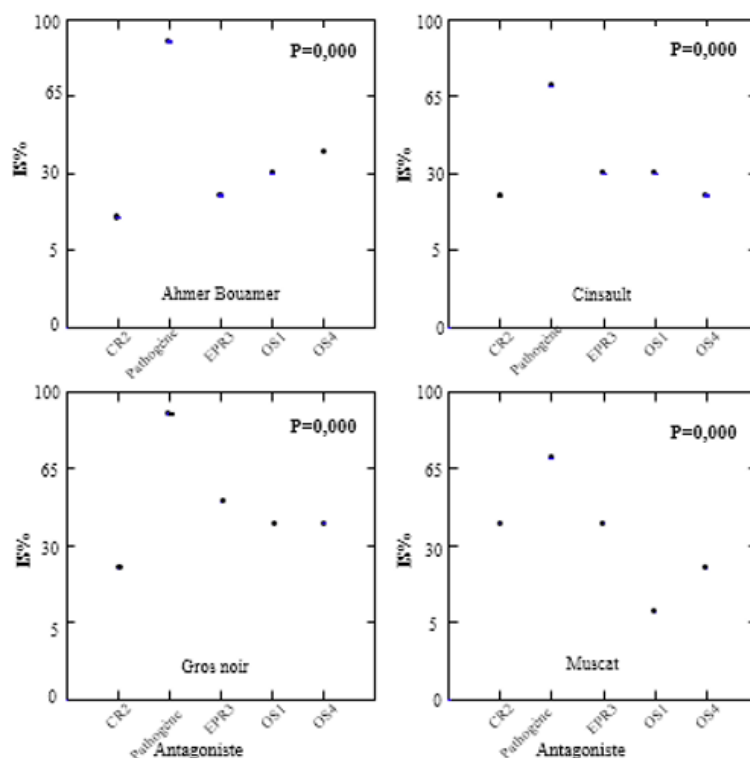


Figure 5 : Relation entre l'indice de sévérité et le pouvoir antagoniste *in vivo* des quatre antagonistes envers l'effet nécrotique des souches d'*A. vitis* sur les quatre variétés de vigne testées.

(IS% : indice de sévérité ; Pathogène : les souches AV25/95, Bu20/95 d'*A. vitis*) (CR2 ; EPR3 ; OS4 ; OS1 : les bactéries antagonistes) (Gros noir ; Cinsault ; Muscat ; Ahmer Bouamer : les variétés de vigne utilisées)

3. Test d'antagonisme *in planta*

Les résultats obtenus nous ont permis de constater une diminution de la sévérité des symptômes du crown gall sur les plantules de tomate et de vigne préalablement trempées dans des suspensions bactériennes des antagonistes, comparées aux témoins qui correspondent aux plantules inoculées directement avec les souches d'*Agrobacterium*.

3.1. Confrontation déphasée *in planta*

Une réduction de la taille des galls formées sur les plantules de tomate et de la vigne préalablement trempées dans des suspensions des bactéries antagonistes ayant une concentration cellulaire égale à celle des souches pathogènes (10^6 CFU/mL) et pendant un délai de 24 h a été notée (Fig. 6 et 7).

3.2. Confrontation simultanée *in planta*

Pour la confrontation simultanée *in planta*, l'inoculation du pathogène juste après le trempage des plantules dans les suspensions des souches antagonistes a permis à ces dernières d'exprimer leur pouvoir antagoniste mais d'une façon très réduite. La durée de temps entre le trempage des plantules dans l'antagoniste et l'inoculation par le pathogène a influencé d'une manière hautement significative l'effet antagoniste des souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* (Fig. 8 et 9).

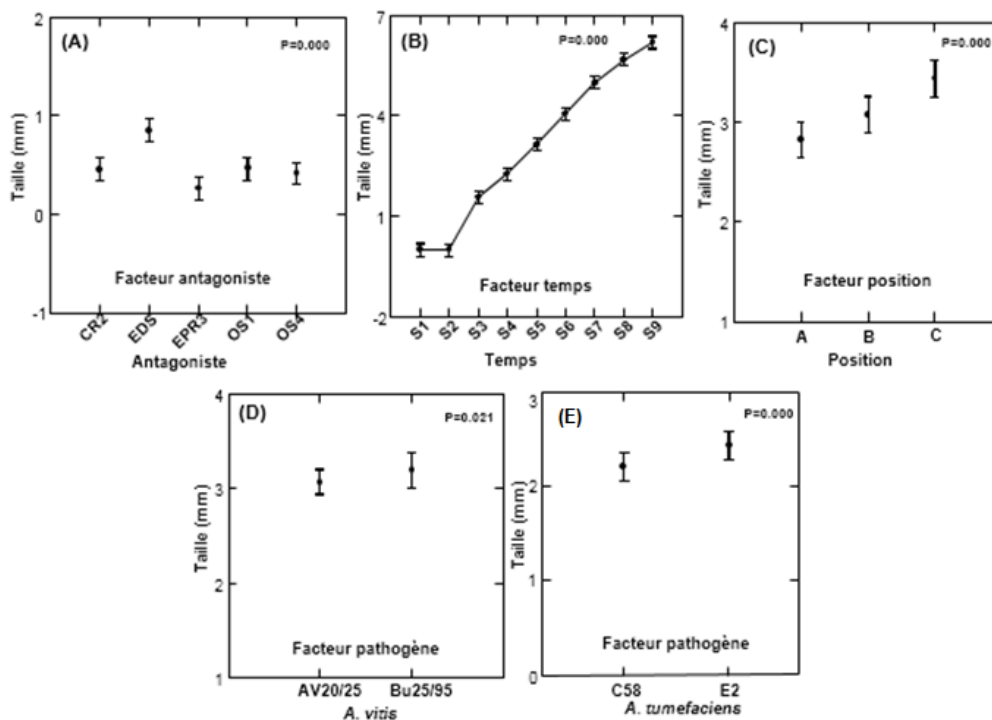


Figure 6 : Effet des souches antagonistes sur les souches pathogènes d’*A. vitis* et d’*A. tumefaciens* en fonction du temps et de la position des blessures sur les plantules de tomate (confrontation déphasée) représenté par la taille des tumeurs.

(Souches *A. vitis* : AV25/95, Bu20/95 ; souches d’*A. tumefaciens* : C58 et E2)- (les bactéries antagonistes testées : CR2 ; EPR3 ; OS4 ; OS1, EDS : eau distillée stérile).(S1 ; S2, S3 ; S4 ; S5 ; S6 ; S7 ; S8 ; S9 : semaines de suivi après l’inoculation par le pathogène). (Position A : au niveau de la partie supérieure de la tige ; position B : au milieu de la tige et position C : au niveau du collet).

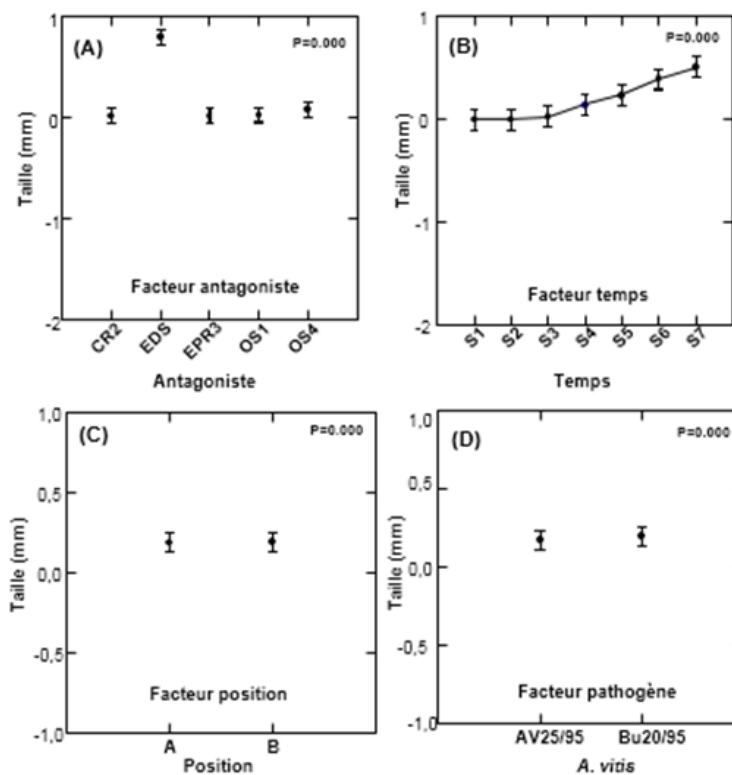


Figure 7 : Effet des antagonistes sur les souches pathogènes d’*A. vitis* en fonction du temps et de la position des blessures sur les plantes de la vigne (confrontation déphasée) représenté par la taille des tumeurs.

(Les souches pathogènes d’*A. vitis* AV25/95 ; Bu20/95)- (les souches antagonistes : CR2 ; EPR3 ; OS4 ; OS1).(S1 ; S2, S3 ; S4 ; S5 ; S6 ; S7 : semaines de suivi après l’inoculation par le pathogène).(Position A : au niveau de la partie supérieure de la tige ; position B : au niveau du collet).

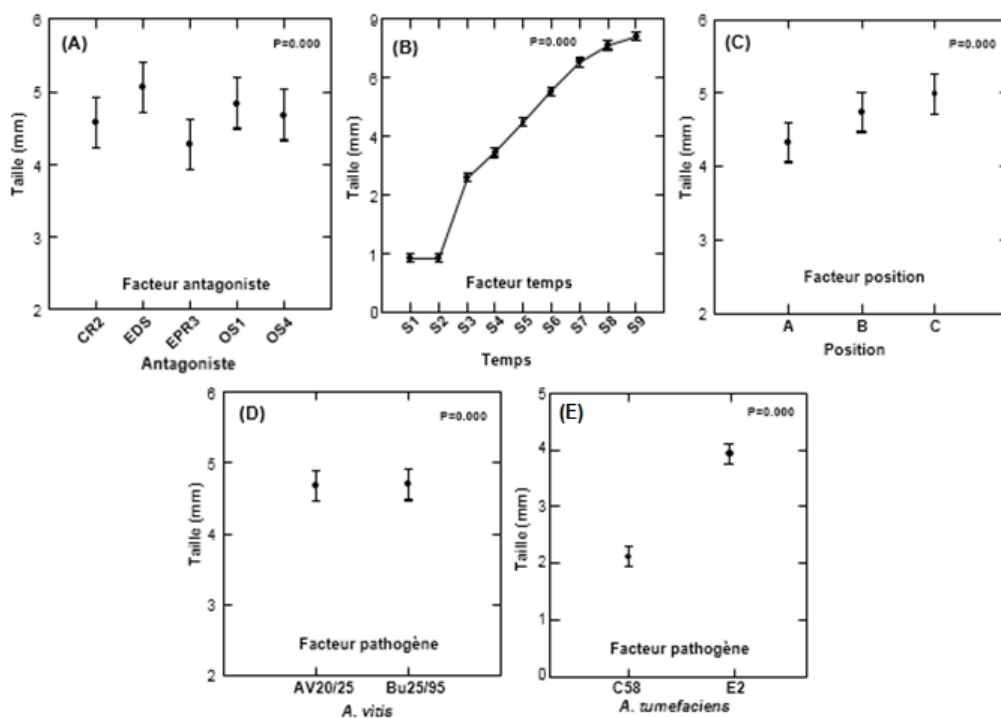


Figure 8 : Effet des antagonistes sur les souches pathogènes d’*A. vitis* et d’*A. tumefaciens* en fonction du temps et de la position des blessures sur les plantules de la tomate (confrontation simultanée) représenté par la taille des tumeurs.

(AV25/95 ; Bu20/95 : les bactéries pathogènes d’*A. vitis* ; C58 et E2 : les souches d’*A. tumefaciens*)- (CR2 ; EPR3 ; OS4 ; OS1 : les bactéries antagonistes). (S1 ; S2, S3 ; S4 ; S5 ; S6 ; S7 ; S8 ; S9 : semaines de suivi après l’inoculation par le pathogène). (Position A : au niveau de la partie supérieure de la tige ; position B : au milieu de la tige et position C : au niveau du collet).

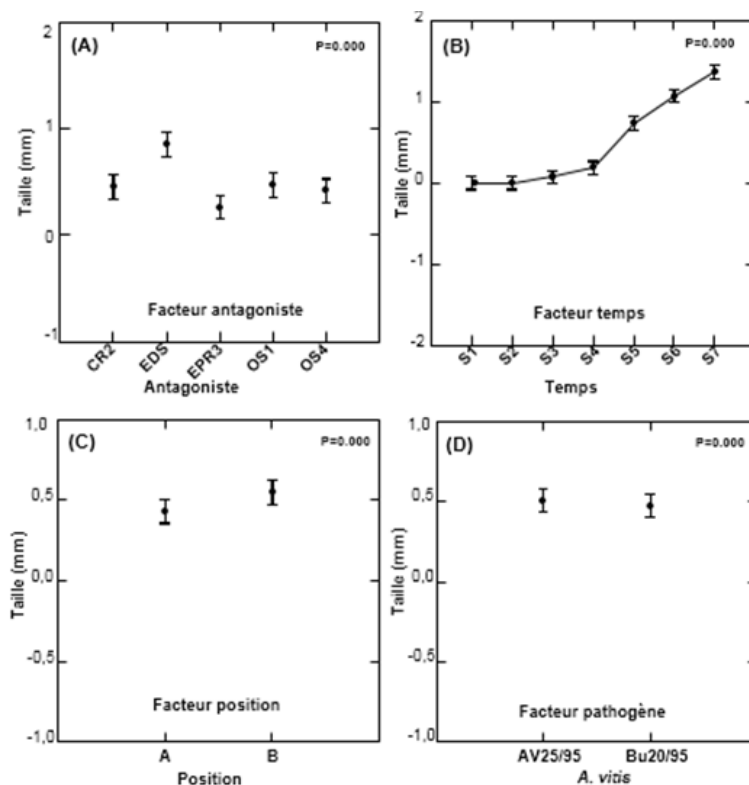


Figure 9 : Effet des antagonistes sur les souches pathogènes d’*A. vitis* en fonction du temps et de la position des blessures sur les plantes de la vigne (confrontation simultanée) représenté par la taille des tumeurs.

DISCUSSION

La présente étude a été menée dans le but de démontrer la capacité des souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* isolées initialement des plantes spontanées [11], à prévenir le développement des tumeurs causées par des souches pathogènes d'*A. tumefaciens* et d'*A. vitis* sur la tomate et la vigne. Les résultats d'antagonisme *in vitro* de *Bacillus* et de *Pseudomonas* ont révélé l'efficacité de ces souches à inhiber la croissance des agrobactéries pathogènes lors des deux techniques de confrontation avec un ratio de concentration cellulaire 1:1.

Les bactéries antagonistes testées ont permis une inhibition élevée de la croissance bactérienne des pathogènes où des diamètres de 0 à 50 mm ont été enregistrés. Cette réduction de la croissance est un critère largement utilisé pour évaluer l'antagonisme microbien [24, 25]. L'activité antagoniste a été différente selon les souches, ce fait suggère que plusieurs substances antibactériennes impliquées dans l'inhibition ont été mises en jeu. Nos résultats concordent avec ceux de Frikha-Gargour *et al.* [26], qui ont montré que 32 souches de *Bacillus* isolées à partir d'échantillons environnementaux ont présenté une activité antibactérienne *in vitro* très importante contre la souche C58 d'*A. tumefaciens* [26].

Aussi, les travaux menés par Habbadi *et al.* [27], qui ont sélectionné 12 souches antagonistes appartenant aux genres *Bacillus*, *Pantoea* et *Acinetobacter*, ont montré une forte activité antibactérienne *in vitro* contre *A. vitis*. Ces résultats peuvent être expliqués par le pouvoir compétiteur très élevé présenté par les souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* et qui leur permet de produire les métabolites antimicrobiens nécessaire pour empêcher la croissance du pathogène [8]. Une étude menée *in vitro* sur une souche de *Bacillus cereus* a montré que cette dernière a la capacité de modifier la composition ionique du milieu de culture en rendant le pH plus élevé, ce qui peut influencer la croissance normale du pathogène [28].

La plupart des souches de *Pseudomonas* utilisées dans le biocontrôle des maladies des plantes, sont capable d'inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes *in vitro* [29].

Cette inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme d'antibiotiques tels que l'acide phenazine-1-carboxylique et les sidérophores [30, 31], se traduisant par la même par une capacité d'induction des mécanismes de défense chez la plante hôte [32].

Nos résultats indiquent aussi, que parmi les bactéries les plus actives du genre *Bacillus*, la souche OS4 a montré un fort pouvoir antagoniste *in vitro*. Le genre *Bacillus* produit une large gamme de métabolites secondaires tels que les antibiotiques, des composés non volatiles, des composés volatiles et des enzymes lytiques [33]. Cette même souche a montré à la fois des effets antagonistes *in vitro* sur d'autres bactéries phytopathogènes tels que *Erwinia amylovora* et *Pectobacterium carotovorum* et stimulateurs de la croissance sur des plants de tomate [11].

La seconde partie de ce travail consacrée à la suppression *in vivo* de l'effet nécrotique d'*A. vitis* par les souches de *Bacillus* spp. et de *Pseudomonas* spp. utilisées, a montré une action efficace des antagonistes testés. Les nécroses sont dues au fait que ces souches pathogènes d'*A. vitis* sont capables de sécréter la polygalacturonase responsable de la dégradation de la paroi de la cellule végétale chez la vigne [34]. La souche CR2 de *Pseudomonas brassicacearum* est la plus efficace, elle a permis la suppression de l'effet nécrotique des deux souches d'*A. vitis* sur les sections des rameaux verts des quatre variétés testées (Gros noir, Cinsault, Muscat et Ahmer Bouamer). Les antibiotiques synthétisés par les souches antagonistes peuvent être impliqués dans l'inhibition de la croissance d'*A. vitis* et par conséquent la réduction ou la suppression de son effet nécrotique [8]. Plusieurs souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* sont connues pour la fonction de synthèse d'enzymes lytiques, impliquées dans la dégradation de différents métabolites du pathogène entre autres, la polygalacturonase et d'autres enzymes comme la chitinase [35].

Les différentes variétés de vigne utilisées au cours de cette expérimentation ont répondu à l'inoculation des souches d'*A. vitis* d'une façon hétérogène. Cette différence de réaction peut être expliquée par la sensibilité des variétés de vigne envers les souches pathogènes même si elles sont toutes des cépages de *Vitis vinifera*, qui est une espèce connue comme susceptible à l'infection par *A. vitis* [21, 36].

Par ailleurs, l'inoculation des sections de tiges de vigne avec les souches antagonistes a conduit à l'apparition des brunissements sur les surfaces de ces sections (nécroses légères), expliquée par la sécrétion de molécules de défense tels que les composés phénoliques à l'égard de la paroi cellulaire des microorganismes en général pathogènes et non pathogènes [37].

Les résultats du test d'antagonisme *in planta*, révèlent l'efficacité des souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* à l'égard des bactéries tumorigènes. L'efficacité *in vitro* s'est traduite par une réduction considérable de la taille des tumeurs chez les deux espèces végétales testées. La bactérisation avec chacune des souches antagonistes : *Bacillus cereus* (OS1), *Bacillus amyloliquefaciens* (OS4), et *Pseudomonas brassicacearum* (EPR3 et CR2) a limité l'installation et l'expression des souches d'*Agrobacterium*, qui s'est traduite par une réduction importante de la taille des galles formées sur la tige des plantules de tomate et de la vigne.

Les résultats de notre étude d'antagonisme *in planta* concordent avec plusieurs recherches qui ont montré que les souches *Pseudomonas aureofaciens* B-4117, *P. fluorescens* CR330D et la souche *Bacillus subtilis* EN63- ont réduit significativement la taille des tumeurs sur des boutures de vigne en dormance et sur d'autres plantes modèles [38,39].

La réalisation des deux techniques de confrontation pour l'interaction antagoniste/pathogène (déphasée et simultanée) *in planta* sur la tomate et la vigne, a confirmé l'influence de la durée du délai de 24 h sur l'efficacité des souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas*.

Une réduction de la taille des galles développées sur les plantules de tomate et de la vigne lors de la confrontation de type déphasée a été notée (24 h) alors que ces mêmes souches ne l'ont pas permis lors de la confrontation simultanée (0h).

La protection conférée aux plantules de tomate et de la vigne inoculées par les souches d'*Agrobacterium* pathogènes au niveau des blessures induites sur la tige alors que la bactérisation par les souches antagonistes a été faite au niveau racinaire, ce qui suggère un effet d'induction systémique de la résistance (ISR), du fait que ces dernières (les bactéries antagonistes) ne sont pas en contact avec l'agent phytopathogène (résultats de travaux en cours d'exploitation).

La colonisation rhizosphérique et endophytique ainsi que la production d'antibiotiques et la capacité des espèces de *Bacillus* et *Pseudomonas* à induire une résistance systémique chez la plante auraient joué un rôle important dans la bioprotection de la tomate et de la vigne [32, 40]. L'élicitation de l'ISR peut être induite par des molécules synthétisées par les souches antagonistes testées. Parmi les molécules élicitrices de défense chez l'hôte végétal les pyoverdines produites par les espèces fluorescentes de *Pseudomonas*. Ce sont des molécules chélatrices du fer (sidérophores) ayant une forte affinité pour les ions Fe^{3+} qui ont inféré une ISR chez *Arabidopsis thaliana*, le haricot, la tomate et l'eucalyptus [41]. Certains composés volatiles semblent aussi avoir une activité élicitrice de l'ISR. Dans ce même contexte, Ryu et ses collaborateurs ont observé que le butanediol, produit par *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a et *B. subtilis* GB03 diminuait significativement l'impact de certains microorganismes phytopathogènes [42]. L'analyse des molécules à l'origine de cet effet serait d'une grande importance afin de compléter ces résultats.

L'utilisation de la tomate et de la vigne comme plantes hôtes nous a permis de suggérer une nette dissemblance entre les réponses de ces deux plantes à l'inoculation par l'antagoniste puis par le pathogène. Toutes les plantes de la tomate ont développé des galles de taille différente (selon la souche antagoniste en interaction avec la souche pathogène) tandis que certaines plantes de la vigne n'ont développé aucune galle. Des études ont montré que les voies métaboliques activées dans le cadre de l'ISR varient en fonction de l'espèce végétale même si le microorganisme inducteur est identique [43].

Concernant la position des blessures causées sur les tiges pour favoriser la formation des galles, nous avons constaté que la blessure située auprès du collet s'est avérée la plus sensible à l'infection en présentant des galles de grande taille par rapport aux autres positions, ce qui peut être dû à la dissemblance entre les tissus de la même plante dans les différentes positions [44].

Notre étude a confirmé le pouvoir antagoniste des quatre souches initialement endophytes (EPR3, CR2, OS1 et OS4) envers les souches tumorigènes d'*Agrobacterium* avec inhibition de la croissance des pathogènes *in vitro* et réduction des effets nécrotiques et tumorigènes *in vivo* et *in planta*.

La concentration cellulaire des antagonistes utilisée s'est avérée efficace *in vitro* mais elle n'a pas montré la même efficacité *in planta*.

CONCLUSION

Les résultats obtenus dans le présent travail montrent que les souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* étudiées peuvent être utilisées comme une source importante de réduction des dégâts de la maladie de la galle du collet tout en intégrant d'autres mesures de lutte. Notre étude de la bioprotection de la tomate et de la vigne par utilisation de ces mêmes bactéries se poursuit par l'étude des mécanismes de défense biochimiques impliqués dans l'induction de la résistance à *A. vitis* et à *A. tumefaciens* afin de révéler les changements sur les composés essentiels qui répriment l'effet nécrotique d'*A. vitis*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **Limanska N. (2012).** Prevention of grape crown gall. *Microbiology and Biotechnology*, 1 (17): 6-21.
- [2]. **Bouzar H., Daouzli N., Krimi Z., Alim A. and Khemici E. (1991).** Crown gall incidence in plant nurseries of Algeria, characteristics of *Agrobacterium tumefaciens* strains, and biological control of strains sensitive and resistant to agrocin 84. *Agronomie*, 11 : 901-908
- [3]. **Krimi Z., Raio A., Petit A., Nesme X. and Dessaux Y. (2006).** *Eucalyptus occidentalis* plantlets are naturally infected by pathogenic *Agrobacterium tumefaciens*. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 237-246.
- [4]. **Bazzi C., Alexandrova M., Stefani E., Anaclerio F. and Burr T.J. (1999).** Biological control of *Agrobacterium vitis* using non-tumorigenic agrobacteria. *Vitis*, 38(1) :31–35.
- [5]. **Kerr A. (1972).** Biological control of crown gall: Seed inoculation. *Journal of Applied Bacteriology*, 35: 493-497.
- [6]. **Rhouma A., Bouri M., Boubaker A. and Nesme X. (2008).** Potential effect of rhizobacteria in the management of crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1. *Journal of Plant Pathology*, 90: 517–526.
- [7]. **Roopa B., Maya C. and Makar H.K. (2012).** Effect of different PGPR strains along with *Rhizobium* on nodulation and chickpea productivity. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 3: 424-426.
- [8]. **Lodewyckx C., Vangronsveld J., Porteous F., Moore E.R.B., Taghavi S., Mezgeay M. and Lelie D.V. (2002).** Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21:586–606.
- [9]. **Raaijmakers J.M., Vlami M. and De Souza J.T. (2002).** Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antony Leeuwenhook*, 81:537-547.
- [10]. **Cavaglieri L., Orlando J., Rodriguez M.L., Chulze S. and Etcheverry M. (2005).** Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the maize root level. *Research Journal of Microbiology*, 156 (5-6) :748-754.
- [11]. **Krimi Z., Alim D., Djellout H., Taffet L., Mohamed Mahmoud F. and Raio A. (2016).** Bacterial endophytes of weeds are effective biocontrol agents of *Agrobacterium* spp., *Pectobacterium* spp., and promote growth of tomato plants. *Phytopathologia Mediterranea*, 55(2): 184-196.
- [12]. **Moore L.W., Kado C.I. and Bouzar H. (1988).** *Agrobacterium*. In Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd ed. New York, APS, Minnesota, USA. 158 p.
- [13]. **Stonier L. (1960).** *Agrobacterium tumefaciens* (Conn II). Production of antibiotic substance. *Journal of Bacteriology*, 79: 880-898.
- [14]. **Rhouma A., Bouri M., Boubaker A. and Nesme X. (2008)** Potential effect of rhizobacteria in the management of crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1. *Journal of Plant Pathology*, 90(3): 517-526
- [15]. **Burr T.J., Katz B.H. and Bishop A.L. (1987).** Populations of *Agrobacterium* in vineyard and non vineyard soils and grape roots in vineyards and nurseries. *Plant Disease*, 71: 617-620.
- [16]. **Stewart E.L. and Wenner N.G. (2004).** Grapevine decline in Pennsylvania and New York. *Wine East July*, 32(2): 12-21.
- [17]. **Burr T.J. and Zheng D. (2012).** Grape crown gall biological control by necrosis-minus mutants of non-tumorigenic *Agrobacterium vitis* strain F2/5. Cornell University, New York, USA. College of Agriculture and Life Sciences.
- [18]. **Oslane I., El yousfi B. Ouabbou H. , El younsi A. et tellal R. (2014).** Evaluation de la sévérité et de la tolérance d'une collection marocaine du blé dur aux pourritures racinaires. *Revue Marocaine de Protection des Plantes*, 5: 17-30
- [19]. **Cooke B.M. (1998).** *Disease assessment and yield loss*. In DG Jones (Ed.), the Epidemiology of plant disease. Kluwer Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp 42-71.
- [20]. **Szegedi E. (1985).** Host range and specific L(+) tartrate utilization of biotype 3 of *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 20:17–22.

- [21]. Burr T.J., Bazzi C., Süle S. and Otten L. (1998). Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Disease*, 82: 1288–1297.
- [22]. Snatiago T. R., Grabowski C., Rossata M. and Romeiro R. S. (2015). Biological control of eucalyptus bacterial wilt with rhizobacteria. *Biological control*, 80 : 14-22.
- [23]. Eastwell K.C., Sholberg P.L. and Sayler R.J. (2006). Characterizing potential bacterial biocontrol agents for suppression of *Rhizobium vitis*, causal agent of crown gall disease in grapevines. *Crop Protection*, 25 (11):1191-1200.
- [24]. Siddiqui I.A. (2001). Effect of microbial antagonists on *in vitro* growth of *Phytophthora aphanidermatum*. *Online Journal of Biological Sciences*, 1(4): 224-226.
- [25]. Bardin S.D., Huang H.C., Liu L. and Yanke L.J. (2003). Control, by microbial seed treatment, of damping-off caused by *Pythium* sp. on canola, sunflower, dry pea and sugar beet. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 25(3):268-275.
- [26]. Frikha-Gargouri O., Ben Abdallah D., Bhar Land Tounsi S. (2017). Antibiosis and *bmyB* Gene Presence As Prevalent Traits for the Selection of Efficient *Bacillus* Biocontrol Agents against Crown Gall Disease. *Frontiers in Plant Science*, 14 August 2017, Volume 8, Article 1363 <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01363>
- [27]. Habbadi Kh., Benkirane R., Benbouazza A., Bouaichi, A., Maafa I., Chapulliot D. and Achbani. E. (2015). Biological Control of Grapevine Crown Gall Caused by *Allorhizobium vitis* using Bacterial Antagonists. *International Journal of Science and Research*, Volume 6 Issue 6, June 2017. DOI: 10.21275/ART20174478
- [28]. Emmert E.A.B. and Handelsman J. (1999). Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 171: 1-9.
- [29]. Ongena M. and Thonart P. (2006). *Resistance induced in plants by non-pathogenic microorganisms: elicitation and defense responses*. In: Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues. 1st ed. Japan: Global Science Books, 447-463.
- [30]. Weller D.M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97 (2): 250-256.
- [31]. Sunich Kumar R., Ayyadurai N., Pandiaraja P., Reddy A. V., Venkateswarlu Y., Prakash O. and Sakathivel 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.
- [32]. Jourdan E., Ongena M. et Thonart P. (2008). Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*, 12(4): 437-449.
- [33]. Kloepper J.W., Ryu C.M. and Zhang S.A. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94: 1259-1266.
- [34]. McGuire R.G. et al. (1991). Polygalacturonase production by *Agrobacterium tumefaciens* Biovar-3. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 660–664.
- [35]. Couillerot O., Prigent-Combaret C., Caballero-Mellado J. and Moe" nne-Loccoz Y. (2009). *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent *Pseudomonads* as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 48: 505–512
- [36]. Roh J.H., Yun H.K., Park K.S., Lee C.H. and Jeong S.B. (2003). *In vivo* evaluation of resistance of grape varieties to crown Gall disease. *Plant Pathology Journal*, 19(5): 235-238
- [37]. Benhamou N. and Rey P. (2012). Elicitors of natural plant defense mechanisms : a new management strategy in the context of sustainable production. Review Article. *Journal Phytoprotection*, 92(1): 1–23.
- [38]. Khmel I.A., Sorokina T.A., Lemanova N.B., Lipasova V.A., Metlitski O.Z., Burdeinaya T.V. and Chernin L.S. (1998). Biological control of crown gall in grapevine and raspberry by two *Pseudomonas* spp. with a wide spectrum of antagonistic activity. *Biocontrol Science and Technology*, 8: 45-57.
- [39]. Eastwell K.C., Sholberg P.L. and Sayler R.J. (2006). Characterizing potential bacterial biocontrol agents for suppression of *Rhizobium vitis*, causal agent of crown gall disease in grapevines. *Crop Protection*, 25:1191-1200.

- [40]. **Van Loon L.C. and Bakker P.A.H.M. (2005).** *Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria.* In: Siddiqui Z.A., ed. *PGPR: Biocontrol and biofertilization.* Dordrecht, The Netherlands: Springer, 39-66.
- [41]. **Höfte M. and Bakker P.A.H.M. (2007).** *Competition for iron and induced systemic resistance by siderophores of plant growth promoting rhizobacteria.* In: *Soil biology: Microbial siderophores.* Heidelberg, Germany: Springer- Verlag Berlin, 121-133.
- [42]. **Ryu C.M. et al. (2004).** Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134 : 1017- 1026.
- [43]. **Adam A. (2008).** Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Thèse de doctorat. Université de Liège, France. 166 p
- [44]. **Creasap J. E., Reid C. L., Goffinet M. C., Aloni R., Ullrich C., and Burr T. J. (2004).** Effect of Wound Position, Auxin, and *Agrobacterium vitis* Strain F2/5 on Wound Healing and Crown Gall in Grapevine. *Phytopathology*, 95(4): 362-367.