



DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/2023

Thèse

Présentée par

BOULAHOUAT Sarah

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT 3^{ème} CYCLE

Filière : SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : MICROBIOLOGIE GENERALE

Thème

**Potentialités des bactéries rhizosphériques et endophytes des palmiers
dans la lutte biologique contre la fusariose vasculaire**

Soutenue publiquement le :...../...../2023

Devant le Jury :

Président

ROUAG Nouredine

Pr. UFA Sétif 1

Directrice de thèse

CHERIF SILINI Hafsa

Pr. UFA Sétif 1

Co-Directeur

BELBAHRI Lassaad

Pr. Univ. Genève , Suisse

Examineur

BENHIZIA Yacine

Pr. UM Constantine 1

BOUDEMAGH Allaoueddine

Pr. UM Constantine 1

KITOUNI Mahmoud

Pr. UM Constantine 1

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mon Père, ma Mère, mon mari et à toute ma famille pour leur soutien tout le long de ma thèse.

A mes amies : Qui m'ont toujours entouré et soutenu.

Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au Laboratoire de Microbiologie Appliquée Faculté des Sciences de la Nature de la Vie, Université Ferhat Abbas -Setif1.

*J'exprime toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse madame **Hafsa CHERIF SILINI** pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour avoir cru en moi. Vos encouragements, vos suggestions, et votre aide précieuse m'ont beaucoup guidé à mener à terme ce travail de recherche. Un grand merci pour sa patience, sa disponibilité, sa compréhension et ses intérêts portés à ce sujet de recherche.*

*Je suis très reconnaissante et je tiens à remercier Monsieur **Lassaad BELBAHRI** professeur à l'Université de Neuchâtel, en Suisse, pour sa précieuse collaboration qui a beaucoup enrichi cette thèse.*

*Je tiens à remercier également Monsieur **Allaoua SILINI** qui m'a fait partager ses connaissances et son expérience. Je le remercie pour sa grande disponibilité, et pour tous ses conseils qui ont enrichi considérablement ce travail.*

*Je tiens à remercier Monsieur **ROUAG Nouredine** pour avoir accepté de présider le jury. Je remercie également Monsieur **BENHIZIA Yacine, BOUDEMAGH Allaoueddine et KITOUNI Mahmoud** pour avoir accepté d'examiner, évaluer et de juger ce travail.*

Production scientifique

Publications :

Boulahouat, S., Cherif-Silini, H., Silini, A., Chenari Bouket, A., Luptakova, L., Saadaoui, N., ... & Belbahri, L. (2022). Critical Evaluation of Biocontrol Ability of Bayoud Infected Date Palm Phyllospheric *Bacillus* spp. Suggests That In Vitro Selection Does Not Guarantee Success in Planta. *Agronomy*, **12**(10), 2403.

Boulahouat, S., Cherif-Silini, H., Silini, A., Bouket, A. C., Luptakova, L., Alenezi, F. N., & Belbahri, L. (2023). Biocontrol Efficiency of Rhizospheric *Bacillus* against the Plant Pathogen *Fusarium oxysporum*: A Promising Approach for Sustainable Agriculture. *Microbiology Research*, **14**(3), 892-908.

Communications internationales :

Boulahouat, S., Cherif-Silini, H., Chenari Bouket, A., Saadaoui, N., Silini, A., & Belbahri, L. 2019. Endophytic *Bacillus halotolerans* isolated from contrasting niches protect the date palm against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Les Journées Internationales de Biotechnologie de l'Association Tunisienne de Biotechnologie. Sousse. Tunisie. 18-21 Déc.

ملخص

ثبت ان استخدام العوامل المحلية البكتيرية المرتبطة بنخيل التمر (*Phoenix dactylifera*. L) ذات القدرة في مكافحة الحبيوية لمرض البيوض الناتج عن فطر (*Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*) (FOA) هو الطريق الواعد. أجريت العزلة البكتيرية انطلاقاً من الجذور، الريزوسفير والتربة لبساتين النخيل الوبائية في وادي مزاب-غرداية-الجزائر. أظهرت 8 عزلات بكتيرية (83، 84، 300، 333، 322، 260، 249 و 227) من أصل 335 عزلة تم اختيارها من 75 سلالة نشطة على FOA، نشاطاً قوياً في المختبر ضد عدة سلالات من هذا الممرض ومسببات الأمراض النباتية الأخرى. أثبت تعريفهم التطوري انتمائهم إلى جنس *Bacillus* (*B. subtilis*، *B. halotolerans*، *B. atrophaeus*)، *B. subtilis* و *B. subtilis*، *B. paralicheniformis*، *B. amyloliquefasciens* sp. إن القدرة المثبطة لهذه البكتيريا ضد FOA في الزراعة المشتركة وطافها اللاخوي مماثلة لتلك الموجودة في الزراعة الأحادية. على عكس المركبات القابلة للانتشار، لم تظهر المركبات العضوية الطيارة قدرة كبيرة مضادة للفطريات. لتقييم التأثير المضاد، في الجسم الحي، تم إصابة بذور نخيل التمر المنتشرة بـ FOA وتم معالجتها بسلالات *Bacillus*. بعد 45 يوماً من الحضانة في درجة حرارة الغرفة وفي الظلام تم تقدير التأثير المثبط للفطريات، حيث أظهرت العزلات 260، 84 و 333 حماية أفضل للجذور ضد الإصابة. أظهرت هذه السلالات البكتيرية إمكانية ملموسة في تحسين نمو النبات وقدرته على تحمل عوامل الإجهاد اللاحيوي. تم تقييم آثارها المفيدة الوقائية والعلاجية والتأثيرات المصاحبة مع FOA في مرحلة الأوراق في الوسط المعقم وفي التربة غير المعقمة. أظهرت النتائج تحسناً في المعايير المورفولوجية وأصباغ الكلوروفيل ونشاط الإنزيم المضاد للأوكسدة. ويلاحظ انخفاض في تركيز عوامل الإجهاد (البرولين والسكر وMDA) بعد التلقيح البكتيري. وبالتالي، يجب أن يجمع عامل مكافحة البيولوجية الفعال بين العديد من الخصائص المفيدة لاستخدامه بنجاح في الموقع. تبقى *Bacillus* المرشح الأفضل للمكافحة البيولوجية.

الكلمات المفتاحية: *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*، نخيل التمر، *Bacillus*، مكافحة الحبيوية.

Résumé

L'utilisation d'agents indigènes de la microflore bactérienne associée au palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) ayant des potentialités dans le biocontrôle de la maladie du Bayoud causée par *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (FOA) est la voie la plus prometteuse. L'isolement bactérien a été réalisé à partir des racines, de la rhizosphère et du sol des palmeraies épidémiques dans la vallée du M'zab-Ghardaïa-Algérie. Un total de 8 isolats bactériens (83, 84, 300, 333, 322, 260, 249 et 227) sur 335 sélectionnés parmi 75 souches actifs sur le FOA, ont montré une forte activité, *in vitro* contre plusieurs souches de ce pathogène et d'autres phytopathogènes. Leur identification phylogénétique a prouvé leur appartenance au genre *Bacillus* (*B. atropaeus*, *B. halotolerans*, *B. subtilis*, *Bacillus* sp, *B. amyloliquefasiens*, *B. paralicheniformis*, *B. subtilis* et *B. subtilis*, respectivement). La capacité inhibitrice de ces bactéries vis-à-vis du FOA en co-culture et leur surnageant acellulaire est identique à celle en monoculture. Contrairement aux composés diffusibles, les composés organiques volatils n'ont pas montré de capacité antifongique significative. Pour évaluer l'effet antagoniste, *in vivo*, des graines germées de palmier dattier ont été infectées par le FOA et traitées par les souches de *Bacillus*. Après 45 jours d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'effet fongistatique a été estimé montrant que les isolats, 84, 260 et 333 manifestent une meilleure protection des racines contre l'infection. Ces souches bactériennes ont montré des potentialités d'amélioration de la croissance végétale et une tolérance aux facteurs du stress abiotique appréciables. Leurs impacts bénéfiques préventif, curatif et concomitant avec le FOA ont été évalués au stade feuille sur support stérile et dans un sol non stérile. Les résultats ont montré une amélioration des paramètres morphologiques, des pigments chlorophylliens et de l'activité des enzymes antioxydantes. Une réduction de la concentration des facteurs de stress (proline, sucre et MDA) est notée après inoculation bactérienne. Ainsi, un agent de lutte biologique efficace doit combiner plusieurs caractéristiques bénéfiques pour être utilisé avec succès *in situ*. *Bacillus* reste le meilleur candidat pour la lutte biologique.

Mots clés : *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, Palmier dattier, *Bacillus*, Biocontrôle.

Abstract

The use of indigenous agents of the bacterial microflora associated with date palm (*Phoenix dactylifera* L.) having potential in the biocontrol of Bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (FOA) is the most promising route. Bacterial isolation was carried out from the roots, rhizosphere and soil of epidemic palm groves in the M'zab-Ghardaïa valley-Algeria. A total of 8 bacterial isolates (83, 84, 300, 333, 322, 260, 249 and 227) out of 335 selected from 75 strains active on FOA, showed strong activity in vitro against several strains of this pathogen and other phytopathogens. Their phylogenetic identification proved their belonging to the *Bacillus* genus (*B. atrophaeus*, *B. halotolerans.*, *B. subtilis*, *Bacillus* sp, *B. amyloliquefasiens*, *B. paralicheniformis*, *B. subtilis* and *B. subtilis*, respectively). The inhibitory capacity of these bacteria against FOA in co-culture and their acellular supernatant is identical to that in monoculture. Unlike diffusible compounds, volatile organic compounds did not show significant antifungal capacity. To evaluate the antagonistic effect, in vivo, germinated date palm seeds were infected with FOA and treated with *Bacillus* strains. After 45 days of incubation at room temperature and in the dark, the fungistatic effect was estimated showing that isolates 84, 260 and 333 showed better protection of the roots against infection. These bacterial strains showed potential for improving plant growth and tolerance to appreciable abiotic stress factors. Their beneficial preventive, curative and concomitant impacts with FOA were evaluated at the leaf stage on sterile support and in non-sterile soil. The results showed an improvement in morphological parameters, chlorophyll pigments and antioxidant enzyme activity. A reduction in the concentration of stress factors (proline, sugar and MDA) is noted after bacterial inoculation. Thus, an effective biological control agent must combine several beneficial characteristics to be used successfully in situ. *Bacillus* remains the best candidate for biological control.

Keywords: *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, Date palm, *Bacillus*, Biocontrol.

Liste des principales abréviations

APX : Ascorbate peroxidase

Chl *a*: Chlorophylle *a*

Chl *b*: Chlorophylle *b*

FOA: *Fusarium oxysporum* sp. *albedinis*

MDA: Malonyldialdehyde

ISR: Induces systemic resistance

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria

ROS : Reactive Oxygen Species

SOD : Superoxyde dismutase

Liste des figures

Fig. 1 : Répartition géographique du palmier dattier dans le monde.

Fig. 2 : Carte du monde des dix premiers pays producteurs de datte en 2014.

Fig. 3 : Distribution géographique du Bayoud dans le nord d’Afrique.

Fig. 4 : (A) Premiers symptômes du Bayoud, (B) Stade final de la maladie.

Fig. 5 : Culture du FOA sur différents milieux de culture.

Fig. 6 : Caractéristiques microscopiques de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*

Fig. 7 : Cycle infectieux du FOA.

Fig. 8 : Représentation schématique des principaux acteurs du processus infectieux de *F. oxysporum*.

Fig. 9 : Mécanismes de biocontrôle des *Bacillus*.

Fig. 10 : Progression du Bayoud en Afrique du Nord et en Algérie (A). Symptômes de la maladie sur palmier infecté (B).

Fig. 11 : (A) Dénombrement des souches bactériennes isolées à partir du sol rhizosphérique sain (HRh) et infecté (IRh), sol non rhizosphérique (SNRh) et à partir des endophytes saines (HR) et infectées (IR) dans des différents milieux de cultures (TSA, GYM et King B). (B) Le taux des isolats actifs envers FOA par site d’isolement (HRh, IRh, SNRh, HR et IR).

Fig. 12 : (A) Pourcentage d’inhibition des souches bactériennes sélectionnées (83, 84, 227, 249, 260, 300, 322 et 333) envers différentes souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (FOA1, FOA2, FOA3, FOA4 et FOA5). (B) Taux d’inhibition des souches bactériennes contre différentes espèces de champignons phytopathogènes (*Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora infestans*).

Fig. 13 : Test de confrontation *in vitro* de l’activité antifongique des souches bactériennes envers les différentes souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (FOA1, FOA2, FOA3, FOA4 et FOA5).

Fig. 14 : Test de confrontation *in vitro* de l’activité antifongique des souches bactériennes envers différentes espèces de champignons phytopathogènes (*Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora infestans*).

Fig. 15 : Arbre phylogénétique à maximum de vraisemblance des souches de *Bacillus* (227, 300, 249, 333, 83, 84, 322 et 260) basés sur la comparaison de la séquence de

l'ARNr 16S des souches bactériennes avec certaines souches phylogénétiquement proches. Les supports pour les branches ont été évalués par un rééchantillonnage bootstrap de l'ensemble de données avec 1000 répétitions.

Fig. 16 : Pourcentage d'inhibition des souches bactériennes combinées envers FOA 1.

Fig. 17 : Test de confrontation, *in vitro*, de l'activité antifongique des souches bactériennes combinées envers FOA 1. Une boîte de Pétri témoin est présentée en dessus.

Fig. 18 : Taux d'inhibition de la croissance du FOA 1 sur gélose PDA contenant les surnageants des différentes souches bactériennes seules ou combinées.

Fig. 19 : Effet des différents surnageants bactériens seuls ou combinés *in vitro* sur la croissance du FOA 1.

Fig. 20 : (A) Pourcentage d'inhibition des substances volatiles (VOCs) produites par les souches bactériennes envers FOA. (B) L'effet antifongique *in vitro* des VOCs produites par les souches bactériennes sur la croissance mycélienne du FOA.

Fig. 21 : (A) Taux d'infection (%), (B) la taille des nécroses racinaires (cm) des graines du palmier dattier. (C) Test de biocontrôle *in vivo* des graines de palmier dattier infectées par le FOA et traitées en même temps avec les différentes souches bactériennes.

Fig. 22 : Activités PGP des différentes souches bactériennes. (A) Production de l'AIA ($\mu\text{g/ml}$). (B) Production des sidérophores (%). (C) Solubilisation des phosphates (mg/ml). (D) Production de HCN, fixation d'azote et la production de NH_3 .

Fig. 23 : Production d'enzymes par les souches bactériennes.

Fig. 24 : (A) Effet des différentes concentrations de NaCl, (B) de PEG₈₀₀₀, (C) différentes valeurs de pH et (D) la température sur la croissance des souches bactériennes.

Fig. 25 : L'effet des différentes concentrations de métaux lourds (Hg, Pb, Cd, Co) sur la croissance des souches bactériennes.

Fig. 26 : Effets des souches bactériennes sur (A,B) la longueur foliaire et racinaire (cm), (C,D) le poids frais des feuilles et des racines (g), et (E,F) le poids sec des feuilles et des racines (g) des plantes de palmier dattier avant et après infection par FOA cultivés en milieu stérile.

Fig. 27 : Effet de l'inoculation par les souches bactériennes sur les paramètres morphologiques du palmier dattier en présence et en absence du FOA cultivé en condition stérile.

Fig. 28 : Effets des souches bactériennes sur la teneur en chlorophylle a, b, totale et en caroténoïdes (mg /g) des plantes de palmier dattier sous le stress du FOA.

Fig. 29 : Effet de l'inoculation par les souches bactériennes sur (A) le contenu foliaire (B) et racinaire en proline ($\mu\text{mol/g}$) du palmier dattier avant et après exposition au stress du FOA.

Fig. 30 : Effet de l'inoculation par les souches bactériennes sur (A) le contenu foliaire (B) et racinaire des sucres totaux (mg/g) du palmier dattier avant et après exposition au stress du FOA.

Fig. 31 : Effet de l'inoculation par les souches bactériennes sur (A) la concentration foliaire (B) et racinaire de MDA ($\mu\text{mol/g}$) du palmier dattier avant et après exposition au stress du FOA.

Fig. 32 : Effet des souches bactérienne sur la teneur en (A) superoxyde dismutase (SOD) ($\mu\text{mole/mn/mg}$ de protéine), (B) gaïacol peroxydase (GPX) ($\mu\text{mole/mn/mg}$ de protéine), (C), Catalase ($\mu\text{mole/mn/mg}$ de protéine) et ascorbate peroxydase (APX) ($\mu\text{mole/mn/mg}$ de protéine) des feuilles de palmier dattier exposées aux stress du FOA.

Fig. 33 : Effet des souches bactériennes sur (A,B) la longueur foliaire et racinaire (cm), (C,D) le poids frais des feuilles et des racines (g), et (E,F) le poids sec des feuilles et des racines (g) des plantes de palmier dattier avant et après infection par FOA cultivés en milieu non stérile.

Fig. 34 : Effet de l'inoculation par les souches bactériennes sur les paramètres morphologiques du palmier dattier en présence et en absence du FOA cultivé en condition non stérile.

Fig. 35 : Effet des souches bactériennes sur la teneur en chlorophylle a, b, totale et en caroténoïdes (mg /g) des plantes du palmier dattier sous le stress du FOA.

Fig. 36 : Effet de l'inoculation par les souches bactériennes sur (A) le contenu foliaire (B) et racinaire en proline ($\mu\text{mol/g}$) du palmier dattier avant et après exposition au stress du FOA.

Fig. 37 : Effet de l'inoculation par les souches bactériennes sur (A) le contenu foliaire (B) et racinaire des sucres totaux (mg/g) du palmier dattier avant et après exposition au stress du FOA.

Fig. 38 : Effet de l'inoculation par les souches bactériennes sur (A) la concentration foliaire (B) et racinaire de MDA ($\mu\text{mol/g}$) du palmier dattier avant et après exposition au stress du FOA.

Fig. 39 : Effet des souches bactérienne sur la teneur en (A) superoxyde dismutase (SOD) ($\mu\text{mole/mn/mg}$ de protéine), (B) gaïacol peroxydase (GPX) ($\mu\text{mole/mn/mg}$ de protéine), (C), catalase ($\mu\text{mole/mn/mg}$ de protéine) et ascorbate peroxydase (APX) ($\mu\text{mole/mn/mg}$ de protéine) des feuilles de palmier dattier exposées aux stress du FOA.

Liste des tableaux

Tab. 1 : les valeurs nutritionnelles de deux cultivars : Deglet Noor et Medjool.

Tab. 2 : Mécanismes de biocontrôle présentés par les espèces de *Bacillus* contre *Fusarium oxysporum*

Table de matière

<i>Dédicace</i>	I
<i>Remerciements</i>	II
Production scientifique	III
ملخص.....	IV
Résumé.....	V
Abstract	VI
Liste des principales abréviations.....	VII
Liste des figures	VIII
Liste des tableaux	XI
Introduction	1
1- Revue bibliographique	4
1-1- Le palmier dattier	4
1-1-2-Taxonomie	4
1-1-3- Distribution géographique.....	5
1-1-4- Importance économique.....	6
1-1-5- Valeurs nutritionnelles des dattes.....	7
1-2- Maladies fongiques du palmier dattier	9
1-2-1- Pourriture de l'inflorescence (Khamedj)	9
1-2-2- Brûlure noire (pourriture du Cœur)	10
1-2-3- Maladie de <i>Diplodia</i>	10
1-2-4- Pourriture du bourgeon (Belâat)	11
1-2-5- Fusariose vasculaire du palmier dattier (Bayoud).....	11
1-2-5-1- Origine et distribution	11
1-2-5-2- Impacts économiques.....	12
1-2-5-3- Symptomatologie du Bayoud	13
1-3- Agent pathogène : <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i>	14
1-3-1- Historique et Taxonomie du genre <i>Fusarium</i>	14
1-3-2- L'espèce <i>Fusarium oxysporum</i>	15
1-3-3- La Forme spéciale : <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i>	16

1-3-3-1- Position taxonomique.....	16
1-3-3-2- Caractéristiques morphologiques et culturelles.....	16
1-3-3-3- Epidémiologie et cycle biologique du FOA.....	18
1-3-3-4- Cycle infectieux du FOA.....	19
1-3-3-5- Mécanismes de virulence du FOA	20
1-3-4- Mécanismes de défense et de résistance du palmier dattier	21
1-3-5- Virulence et perception de l'hôte	22
1-3-6- Diagnostic et détection du pathogène	24
1-3-7- Contrôle de la maladie du Bayoud	26
1-3-7-1- Mesures prophylactiques	27
1-3-7-2- Lutte chimique	27
1-3-7-3- Solarisation et fumigation.....	27
1-3-7-4- Pratiques culturelles.....	28
1-3-7-5- Contrôle génétique.....	28
1-3-7-6- Contrôle biologique.....	29
1-4- Gestion de la fusariose par le contrôle biologique	30
1-4-1- Mécanismes de biocontrôle par <i>Bacillus</i>	31
1-4-1-1- Production d'antibiotiques.....	31
1-4-1-2- Production d'enzymes lytiques.....	37
1-4-1-3- Production de sidérophores	38
1-4-1-4- Résistance systémique induite.....	40
1-4-1-5- Composés organiques volatiles (VOCs).....	41
1-4-1-6- Compétition pour les nutriments et l'espace.....	42
1-4-2- Réponses des BCA <i>in situ</i>	44
2- Matériels et méthodes.....	48
2-1- Isolement, criblage et caractérisation des souches bactériennes	
à caractère antagoniste.....	48
2-1-1- Description et localisation des sites de prélèvement.....	48
2-1-2- Matériel biologique.....	49
2-1-2-1- Souches fongiques.....	49
2-1-2-2- Matériel végétal.....	50
2-1-3- Isolement des bactéries.....	50
2-1-4- Dépistage <i>in vitro</i> de l'activité antifongique des isolats bactériens.....	51

2-1-5- Potentialités antifongiques des souches sélectionnées.....	51
2-1-6- Caractérisation moléculaire des souches bactériennes sélectionnées.....	52
2-1-6-1- Extraction de l'ADN bactérienne et amplification de l'ARNr 16S.....	52
2-1-6-2- Séquençage de l'ADN et analyse phylogénétique.....	52
2-1-7- Effet de la coculture bactérienne sur la croissance du FOA.....	53
2-1-8- Effet des surnageants bactériens sur la croissance du FOA.....	53
2-1-9- Activité antifongique des composés organiques volatiles (VOCs).....	54
2-1-10- Test de biocontrôle, <i>in vivo</i> , sur les racines du palmier dattier	54
2-1-11- Mesure des potentialités améliorant la croissance des plantes (PGP)	
des bactéries sélectionnées.....	54
2-1-11-1- Production de l'acide indole acétique.....	55
2-1-11-2- Solubilisation des phosphates	55
2-1-11-3- Production de sidérophores.....	55
2-1-11-4- Production d'HCN.....	55
2-1-11-5- Production de NH ₃	56
2-1-11-6- Fixation d'azote.....	56
2-1-12- Production d'enzymes hydrolytiques.....	56
2-1-13- Effets des stress abiotiques (sel, pH, PEG et température) sur la croissance	
des souches bactériennes.....	56
2-1-14- Détermination de la résistance aux métaux lourds	57
2-2 – Effets du biocontrôle des <i>Bacillus</i> , <i>in vivo</i> , contre la Fusariose du	
palmier dattier	57
2-2-1- Souches bactériennes.....	57
2-2-2- Préparation de l'inoculum bactérien et fongique.....	57
2-2-3- Essai sur support stérile.....	58
2-2-4- Essai sur sol non stérile	59
2-2-5- Analyse des paramètres morfo- biochimiques des plantes.....	60
2-2-5-1-Paramètres morphologiques.....	60
2-2-5-2- Paramètres biochimiques.....	60
- Dosage de la chlorophylle.....	60
- Dosage du malondialdéhyde (MDA).....	60
- Estimation du contenu en proline.....	61
- Estimation des sucres totaux.....	61

- Dosage des protéines solubles.....	61
2-2-6- Détermination de l'activité des enzymes antioxydantes.....	61
- La gaïacol peroxydase (GPX).....	61
- L'ascorbate peroxydase (APX).....	62
- La superoxide dismutase (SOD).....	62
- La catalase	62
2-2-7- Analyses statistiques.....	62
3- Résultats.....	64
3-1- Recherche de bactéries antagonistes du FOA <i>in vitro</i>.....	64
3-1-1- Dénombrement, isolement et sélection des bactéries antagonistes.....	64
3-1-2- Potentialités antifongiques des souches sélectionnées.....	66
3-1-3- Identification moléculaire des souches bactériennes et leurs positions phylogénétiques.....	70
3-1-4- Effet de la coculture bactérienne sur la croissance du FOA.....	72
3-1-5- Effet des surnageants bactériens sur la croissance du FOA.....	76
3-1-6- Activité antifongique par les substances organiques volatiles (VOCs).....	81
3-1-7- Test de biocontrôle, <i>in vivo</i> , sur les graines du palmier dattier.....	83
3-1-8- Potentialités PGP des bactéries sélectionnées.....	84
3-1-9- Production d'enzymes.....	88
3-1-10- Effet du sel, du pH, du PEG et de la température sur la croissance des souches bactériennes.....	88
3-1-11- Détermination de la résistance aux métaux lourds.....	90
3-2- Effets de l'inoculation des souches bactériennes sur les paramètres morpho- biochimiques du palmier dattier sous stress biotique.....	91
3-2-1- Sur sol stérile	91
3-2-1-1- Paramètres morphologiques.....	91
3-2-1-2- Paramètres biochimiques.....	96
- Chlorophylle.....	96
- Proline.....	97
- Sucres totaux.....	98
- Malondialdehyde (MDA).....	99
3-2-1-3- Détermination de l'activité des enzymes antioxydantes.....	101
3-2-2 Sur sol non stérile	103

3-2-2-1- Paramètres morphologiques.....	103
3-2-2-2- Paramètres biochimiques.....	107
- Chlorophylle.....	107
- Proline.....	107
- Sucres totaux.....	109
- Malondialdéhyde (MDA).....	110
3-2-2-3- Détermination de l'activité des enzymes antioxydantes.....	111
4- Discussion.....	113
Conclusion.....	127
Références bibliographiques.....	129
Annexe	

Introduction

En Algérie, la culture du palmier dattier joue un rôle très important dans l'agriculture et l'économie des régions désertiques. Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est la principale culture fruitière du désert dans les régions arides et le pilier des écosystèmes oasiens (Djerbi, 1994 ; Hassan *et al.*, 2021). Sur le plan socio-économique, la datte constitue la principale production des régions sahariennes. En effet, elle contribue au revenu agricole des populations de ces régions (De la Perrière *et al.*, 1995) et constitue la base de l'alimentation humaine et animale. Les palmiers sont également une partie vitale de la culture et de l'agro biodiversité de la région. De plus, les dattes ne sont pas seulement un aliment de base, mais aussi une importante culture commerciale d'exportation (Sidky, 2017). Néanmoins, les palmiers dattiers sont sensibles à plusieurs maladies et ravageurs qui limitent leur production. De nombreuses maladies graves du palmier dattier ont été signalées en association avec différentes espèces de *Fusarium* (Al-Sharidah, 2017 ; Abedalred *et al.*, 2019). *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (FOA) infecte le palmier dattier et entraîne la flétrissure vasculaire appelée Bayoud qui est sans aucun doute la maladie cryptogamique la plus grave du palmier dattier en Afrique du Nord (Ahmed *et al.*, 2019). Il est classé sur la liste « A2 » de l'OEPP des organismes de quarantaine et sur la liste « A » des organismes nuisibles contre lesquels une surveillance et un contrôle sont obligatoires en Algérie (OEPP/EPP, 1982 ; Bahriz and Bouras, 2020).

A ce jour, aucun traitement curatif n'existe contre ce champignon (Kaddouri *et al.*, 2020). Les moyens préconisés contre la maladie sont la lutte chimique (utilisation de fongicides, éradication et incinération du palmier, désinfestation du sol par solarisation et fumigation). Malheureusement, le contrôle chimique affecte le microbiote bénéfique du sol et peut s'accumuler dans la chaîne alimentaire (De Lamo and Takken, 2020). De plus, l'utilisation de cultivars résistants ne permet pas d'obtenir une haute qualité alimentaire des dattes (Sedra, 2005). La plupart des variétés commerciales, telles que Deglet-Nour, sont très sensibles et nécessitent une gestion intensive pour les protéger contre l'agent pathogène.

L'utilisation de micro-organismes est l'une des méthodes de lutte biologique les plus prometteuses pour supprimer les maladies des plantes. De nouvelles approches impliquent l'utilisation de bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPB) qui sont connues pour leurs capacités à favoriser et stimuler la croissance des plantes et à protéger les plantes hôtes contre les phytopathogènes (Cherif-Silini *et al.*, 2019).

Pour entreprendre un contrôle biologique de ces maladies, le choix des microorganismes antagonistes du pathogène est un critère très important. Les antagonistes doivent être efficaces *in situ* en présentant une aptitude significative à la compétition ou à l'antibiose. De plus, ils doivent persister dans les sols et être capables de coloniser rapidement les racines des plantes. Par conséquent, il est très important de développer une stratégie fiable et pratique pour cribler des inoculants efficaces avec une résistance à large spectre contre plusieurs stress environnementaux (Cherif-Silini *et al.*, 2021).

Les procédures de sélection des inoculants bactériens appropriés sont une étape limitante pour un contrôle biologique réussi. Les procédures de sélection *in vitro* utilisées comme méthode de dépistage, telles que la double culture de pathogènes fongiques sur des plaques de gélose, peuvent être inappropriées car elles excluent les facteurs d'interaction hôte-antagoniste-pathogène et ne permettent pas la sélection d'agents de lutte biologique utilisant d'autres mécanismes tels que colonisation racinaire, induction de résistance systémique et/ou compétition de niche (Pliego *et al.*, 2011). Bien que la majorité des études utilisent la production de métabolites sur des milieux de culture pour les tests de dépistage, seules quelques études ont comparé les résultats de différentes stratégies de dépistage et ont conclu que les tests sur la plante entière étaient la stratégie la plus efficace (Knudsen *et al.*, 1997 ; Besset-Manzoni *et al.*, 2019). Les méthodes de dépistage doivent avoir des mécanismes de contrôle multifactoriels ou médiés par les plantes (Cherif-Silini *et al.*, 2021).

Les bactéries les plus étudiées en lutte biologique appartiennent aux genres *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter* et *Pseudomonas*. *Bacillus* est l'un des genres les plus abondants dans le sol et le plus étudié comme agent de lutte biologique. Il a été isolé de la rhizosphère de diverses plantes (Slama *et al.*, 2019 ; Cherif-Silini *et al.*, 2016). Ces agents de lutte biologique particuliers sont utilisés non seulement pour remplacer les pesticides chimiques, mais pour améliorer la croissance des plantes et atténuer divers stress environnementaux naturels (salinité, aridité, température extrême et pH) (Kerbab *et al.*, 2021 ; Rabhi *et al.*, 2022). En plus de ses différents bienfaits pour la santé des plantes, *Bacillus*, avec sa capacité à former des spores résilientes, est en fait une cible très prometteuse pour des applications agricoles (Shao *et al.*, 2022). Les spores sont très résistantes à divers stress abiotiques ce qui facilite leur formulation pour une application agricole (Borriss, 2015). L'existence de plusieurs traits souhaitables dans un seul inoculant

ou un consortium de bactéries pourrait donc être utilisée avec succès dans de telles études (Cherif-Silini *et al.*, 2021 ; Kerbab *et al.*, 2021).

La présente étude vise à proposer l'utilisation de bactéries antagonistes potentielles indigènes à la rhizosphère du palmier pour contrôler une grave maladie du palmier. Pour atteindre cet objectif, des souches bactériennes (rhizosphériques et endophytes) à activité antifongique contre les FOA sont isolées du sol et des racines de palmiers dattiers sains et infectés de la région de Ghardaïa. Les bactéries antagonistes les plus efficaces sont testées pour leur antagonisme vis-à-vis des autres phytopathogènes, pour leur potentiel PGP et enzymatique, et leur tolérance aux stress abiotiques. Pour évaluer leurs performances dans le biocontrôle des FOA, ces souches bactériennes sont testées *in vivo* sur les racines d'un palmier dattier Deglet Nour infecté par le pathogène. Une estimation des effets de l'inoculation par ces souches en présence du pathogène sur les paramètres morpho-biochimiques des plantes de palmier dattier est ainsi réalisée enfin du travail.

1- Revue bibliographique

1-1- Le palmier dattier

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), connu depuis la plus haute Antiquité, est l'une des variétés d'arbres les plus anciennes (5500–3000 avant notre ère). Il est l'élément clé de l'écosystème oasien et « l'arbre » fruitier par excellence. Cette espèce fruitière est connue pour sa tolérance aux conditions climatiques extrêmes d'aridités. Ainsi, le palmier dattier présente l'immense bénéfice de lutter contre la désertification par l'interception du rayonnement solaire intense et la mise en place d'un « barrage vert et productif » ; l'oasis. Il constitue le pivot de l'agriculture oasienne qui permet la création d'un milieu typique favorable à la pratique d'autres cultures sous-jacentes (arboricoles, céréalières, maraichères ...). La présence du palmier dattier dans ces zones lui confère un rôle écologique indéniable en y limitant la progression des espaces steppiques et l'ensablement des terres agricoles (Belguedj, 2002). Ceci garantit ainsi une certaine autonomie économique du milieu oasien. En outre les diverses utilisations du palmier dattier et de ses produits dans la vie des habitants des oasis montrent le rôle primordial qu'il tient dans ces régions (Ben Abdallah, 1990). Il constitue pour les populations de ces régions l'arbre de la providence qui fournit non seulement des dattes, nourriture riche pour les hommes et les animaux, mais également un grand nombre de productions diverses qui sont très utiles aux familles des phoeniculteurs (Ben Othman, 1996). Cette espèce fruitière a un grand intérêt par sa productivité élevée et la qualité de ses fruits très recherchée, (Zaid *et al.*, 2002).

1-1-2-Taxonomie

Le palmier dattier est connu sous le terme générique *Phoenix dactylifera* L. Cette appellation botanique donnée par Linné depuis 1734 est vraisemblablement dérivé du mot "*Phœnix*" qui signifie **dattier** chez les Grecs et "*dactylifera*" vient de latin "*dactylus*" signifiant **doigt** en raison de la forme du fruit la datte (Zaid, 2002).

Le palmier dattier est une plante monocotylédone dioïque. Elle regroupe 200 genres représentés par 2700 espèces réparties en six sous-familles. Le palmier appartient à la sous-famille des Coryphoidea subdivisée en trois tribus. Il est le seul genre de la tribu des Phoeniceae (Soudani, 2015). Le palmier dattier est systématiquement classé dans le règne végétal comme suit :

Règne : Plantae

Classe : Monocotylédones

Ordre : Palmales (Arecales)

Famille : Palmaceae (Arecaceae)

Sous-famille : Coryphoidea

Tribu : Phoeniceae

Genre : *Phoenix*

Espèce : *Phoenix dactylifera* L.

1-1-3- Distribution géographique

Le palmier dattier est une plante pérenne. Sa distribution géographique est assez large dans l'hémisphère Nord. Le milieu favorable pour la culture du palmier dattier est situé entre la latitude Nord 24° et 34° (Hussein, 1979). Une forte expansion de la culture du palmier dattier est observée en Afrique méditerranéenne et au Moyen-Orient (Fig.1). La répartition du palmier dattier selon les continents et les zones géographiques montre qu'il prédomine essentiellement en Asie (Iran, Irak) avec 50% et seulement 26% pour l'Afrique du Nord (Moulay, 1995). Le palmier dattier est également cultivé dans d'autres pays tels que l'Espagne qui est l'unique pays européen producteur de dattes notamment dans la palmeraie d'Elche. Aux Etats- Unis d'Amérique, sa culture n'a débuté réellement que vers les années 1900 avec l'importation de variétés irakiennes. Toutefois, sa culture est également signalée dans d'autres régions du monde (Argentine, Brésil, Thaïlande, Namibie, Afrique du Sud) (Absi, 2013). En Algérie, la répartition du palmier dattier est essentiellement localisée dans le Sud du pays (au Sud de l'Atlas saharien) où les conditions écologiques sont favorables pour son développement. Les zones concernées sont : les Zibans, l'Oued Righ, Ouargla, le Souf, le M'zab, le Touat, le Gourara, la Saoura, le Hoggar et le Tidikelt (Saggai, 2001).

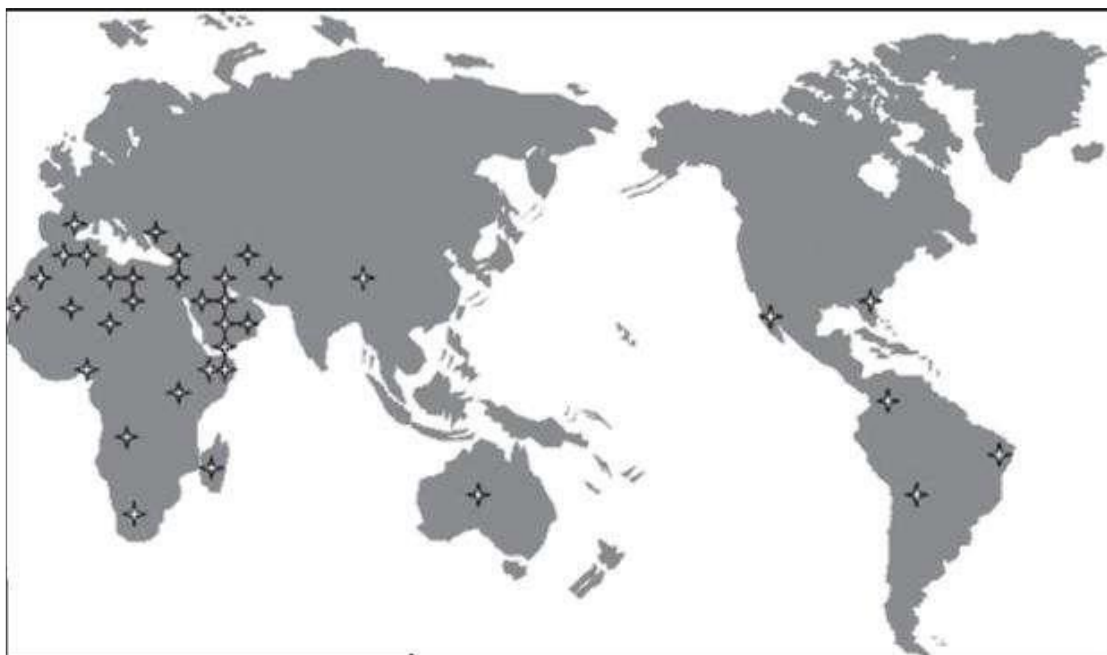


Fig. 1 : Répartition géographique du palmier dattier dans le monde (Belaroussi, 2019).

1-1-4- Importance économique

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est la culture de subsistance la plus importante dans les régions arides et la péninsule arabique, l'Afrique du Nord et le Moyen-Orient Est, où les dattes sont la principale source de revenu et aliment de base pour les populations locales pendant des siècles. Dans le monde, 1,3 million d'hectares seraient dédiés à la culture du dattier où le nombre est évalué à plus de 100 millions, effectif qui augmente chaque année (Al-Alawi, 2017). Les pays producteurs sont l'Égypte, l'Iran, l'Arabie Saoudite, l'Iraq et l'Algérie (Palou *et al.*, 2016). L'Algérie est considéré comme un pays phoenicicole classé au premier rang dans le Maghreb pour ses grandes étendues de culture. D'après les chiffres de la FAO, la superficie en 2020 est de 170 500 ha avec un nombre total d'environ 18 millions de palmiers. Le secteur algérien comprend environ 800 cultivars de palmier dattier. L'Algérie, qui est l'un des principaux producteurs de dattes au monde, figure parmi les dix pays qui dominent la production mondiale de dattes. Selon un rapport de la FAO, l'Algérie a produit plus de 1,4 million de tonnes de dattes en 2022, ce qui représente une augmentation de 7% par rapport à l'année précédente. L'Égypte est le plus grand producteur mondial de dattes, avec une production de 1,747 million de tonnes en 2022, suivie de l'Arabie saoudite, qui a produit 1,565 million de tonnes. L'Algérie arrive en troisième position, avec une part de marché de 13%. Les autres pays figurant dans le top 10 des plus grands producteurs de dattes sont l'Iran, l'Iraq, la Tunisie, le

Pakistan, Oman, les Émirats Arabes Unis et le Maroc (Fig. 2). La diversité phoenicicole de notre patrimoine est caractérisée par l'existence d'une multitude de variétés, mais seules quelques-unes ont une importance commerciale. La variété Deglet Nour occupe plus de 60 % du nombre total du palmier. Environ 40% du montant total des exportations agricoles sont assurés par cette variété noble (FAO, 2022).

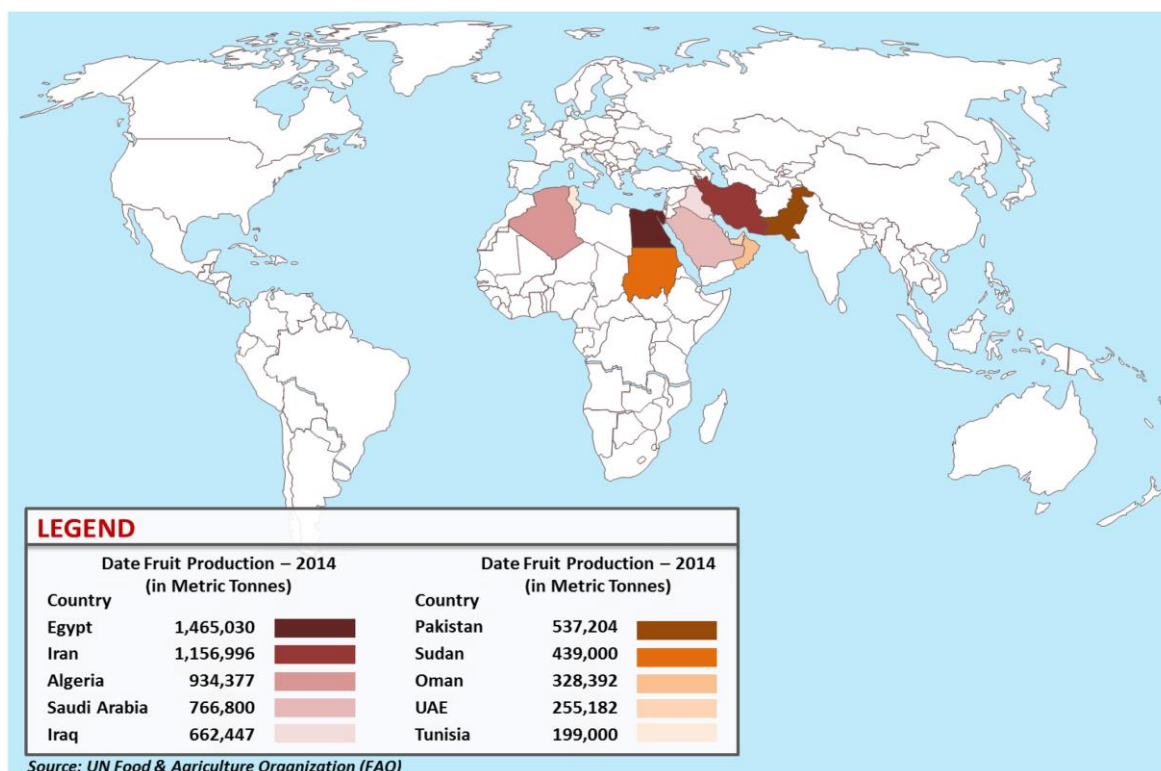


Fig. 2 : Carte des dix premiers pays producteurs de datte en 2014 (Al-Alawi, 2017).

1-1-5- Valeurs nutritionnelles des dattes

Dans l'alimentation humaine, les fruits de dattes sont une source riche en sucres, protéines, fibres, minéraux et vitamines. C'est une source d'énergie rapide en raison de leur forte teneur en sucre. Lorsque les fruits arrivent à maturité, le saccharose s'inverse en glucose et fructose. De plus, les dattes contiennent des quantités raisonnables de vitamine A, de thiamine, de riboflavine et de niacine et sont une bonne source de minéraux tels que le potassium, le calcium et le fer, ainsi que de fibres alimentaires. D'un autre côté, le secteur des aliments naturels fait la promotion de la consommation de dattes en tant qu'aliment fonctionnel et possédant des qualités antioxydantes. Chaque cultivar de dattes possède un profil individuel de valeurs nutritionnelles (Tab.1) (Johnson *et al.*, 2015).

Tab. 1 : Valeurs nutritionnelles de deux cultivars : Deglet Noor et Medjool (Johnson *et al.*, 2015).

Nutriment	Unité	Valeur par 100g	
		Deglet Noor cv.	Medjool cv.
<i>Proximités</i>			
Eau	g	20.53	21.32
Énergie	Kcal	282	277
Protéine	g	2.45	1.81
Lipide totaux	g	0.39	0.15
Carbohydate	g	75.03	74.97
Fibre	g	8.0	6.7
Sucres totaux	g	63.35	66.47
<i>Minéraux</i>			
Calcium, Ca	mg	39	64
Ions, Fe	mg	1.02	0.90
Magnésium, Mg	mg	43	54
Phosphore, p	mg	62	62
Potassium, K	mg	656	696
Sodium, Na	mg	2	1
Zinc, Zn	mg	0.29	0.44
<i>Vitamines</i>			
Vitamine C, Acide ascorbique	mg	0.4	0.0
Thiamine	mg	0.052	0.050
Riboflavine	mg	0.066	0.060
Niacine	mg	1.274	1.610
Vitamine B ₆	mg	1.165	0.249
Folate	µg	19	15
Vitamine A	µg	10	149
Vitamine E	mg	0.05	-
Vitamine K	µg	2.7	2.7

1-2- Maladies fongiques du palmier dattier

La culture du palmier dattier est sujette à divers problèmes phytosanitaires qui entravent son développement et son extension. Plusieurs maladies des palmiers dattiers sont signalées dans de nombreux pays producteurs de dattes. Les palmiers sont généralement robustes et peu sensibles aux maladies. Toutefois, si les conditions de culture ne leur conviennent pas ou qu'ils sont fragilisés par des parasites ou un climat défavorable (Aberlenc-Bertossi, 2010), certaines maladies peuvent les atteindre et peuvent entraîner, soit la mort du palmier, soit des symptômes particuliers entraînant une baisse ou une perte totale de la production. La plupart des agents pathogènes importants des palmiers sont des champignons on peut citer, la pourriture de l'inflorescence (khamej), la pourriture du cœur, la pourriture du bourgeon, les maladies des fruits et les maladies à dépérissement (Ammar et El-naggar, 2011). Cependant la maladie la plus destructive et la plus menaçante dans l'Afrique du Nord est le Bayoud, qui provoque un dépérissement irréversible du palmier dattier et, par conséquent, des dégâts considérables et définitifs. Ainsi le patrimoine du palmier dattier des régions phœnicicoles, est attaqué depuis plusieurs décennies, et continue à l'être toujours, particulièrement au Maroc et en Algérie (El Hadrami *et al.*, 2005).

1-2-1- Pourriture de l'inflorescence (Khamedj)

La pourriture de l'inflorescence est une maladie causée par *Mauginiella scaetae*, un champignon imparfait (Bounaga et Djerbi, 1990). Ce champignon attaque les inflorescences mâles et femelles des dattiers dès le début de leur développement, avant leur sortie de la spathe qui les enveloppe complètement. Cependant, la spathe du dattier ne s'ouvre pas dans bien des cas et tout son contenu meurt et se dessèche. Le symptôme de la maladie se traduit par une tache brune qui se développe sur le jeune spadice et qui s'accroît progressivement et finit par intéresser la plus grande partie du jeune régime (Abdullah *et al.*, 2010). En effet, les tissus bruns envahis par le champignon se recouvrent d'une abondante poussière blanche constituée par les spores de *M. scaetae*. L'infection par l'agent pathogène est d'origine externe puisqu'elle se produit à travers une spathe morphologiquement intacte et qui ne nécessite ni blessure préalable ni piqûre d'insecte (Chabrolin, 1930). Le champignon se conserve sous forme de mycélium latent et ses spores semblent n'avoir qu'une faible longévité car ces dernières ne persistent pas durant l'hiver (Bounaga et Djerbi, 1990).

Pour que la maladie soit contrôlable, la destruction par le feu des inflorescences atteintes est considérée comme un premier moyen de lutte contre le Khamedj. Différents fongicides sont ainsi appliqués comme traitement chimique sur des dattiers malades. L'application de *dichlone*, le *thirame* et le *Score 250 EC* (Difenoconazole) se sont révélés être les plus efficaces contre *M. scaetiae* (Al-fadhl et Sharif, 2013).

1-2-2- Brûlure noire (pourriture du Cœur)

La brûlure noire, appelée aussi *Mejnoun* (palmier fou) est une maladie causée par *Thielaviopsis paradoxa* et *T. punctulata* (Abdullah *et al.*, 2010). Ces phytopathogènes provoquent une pourriture au niveau des feuilles, des inflorescences, du cœur et du tronc ou du bourgeon après leur pénétration dans les tissus (Saeed *et al.*, 2016). Selon le moment de l'infection et le stade de développement de la maladie, les symptômes typiques du noircissement sont des lésions noires dures sur les feuilles, des brûlures au niveau des inflorescences et une pourriture du tronc et des bourgeons (Saeed *et al.*, 2017). Parfois, la couronne se décompose laissant un tronc nu ou contrairement certains palmiers récupèrent leur croissance par le développement d'un bourgeon latéral issu à partir des tissus méristématiques du bourgeon terminal non infecté. Dans ce cas, les paumes repoussent et récupèrent leur croissance normale pendant plusieurs années et c'est pourquoi on l'appelle en arabe *Medjnoon* (Abdullah *et al.*, 2010).

Le contrôle chimique utilisant des fongicides comme *Mycostop* (Suleman *et al.*, 2002) ainsi qu'un contrôle biologique par l'application des agents de biocontrôle (BCA) est réalisé pour la lutte contre ces pathogènes (Ziedan *et al.*, 2013 ; Al-Naemi *et al.*, 2016).

1-2-3- Maladie de *Diplodia*

La maladie de *Diplodia*, causée par *Diplodia phoenicum* (Sacc), est signalée sur 20 variétés de dattes dans le monde entier, bien qu'elle semble être la plus répandue chez Deglet Nour. Les symptômes sont sévères sur les rejets et se caractérisent par la mort, soit quand ils sont encore attachés à la paume de la mère, soit après qu'ils sont détachés et plantés. Le champignon peut infecter les feuilles extérieures et tuer finalement les feuilles les plus jeunes et le bourgeon terminal. Les symptômes de la maladie se caractérisent par des stries brun jaunâtre qui s'étendent sur le long de la base de la feuille (Zaid *et al.*, 2002). Étant donné que le champignon pénètre habituellement dans la paume par des blessures causées lors de l'élagage, une précaution consiste à désinfecter tous les outils et les surfaces coupées. Le trempage ou la pulvérisation de produits chimiques divers dans les rejets

(bénomyl, bouillie bordelaise, méthylthiophanate, thirame et autres fongicides à base de cuivre) se sont révélés très efficace contre la maladie (Zaid *et al.*, 2002).

1-2-4- Pourriture du bourgeon (Belâat)

Le Belâat causé par *Phytophthora* sp. est une maladie qui se caractérise par un blanchissement des palmes du cœur et par une pourriture humide à progression rapide (Djerbi, 1990). Quand le champignon atteint le bourgeon terminal, le palmier meurt. Accompagnée d'organismes secondaires, l'infection progressera dans le tronc sous la forme d'une pourriture conique du cœur humide, libérant une odeur de fermentation acétique et butyrique. D'autre part, les branches des palmiers infectés restent généralement indemnes à la maladie (Abdullah *et al.*, 2010).

Pour maîtriser la maladie à un stade plus précoce, il est recommandé de pulvériser un mélange de Manèbe ou le mélange de Bordeaux (Bordo Mix) (Zaid *et al.*, 2002).

1-2-5- Fusariose vasculaire du palmier dattier (Bayoud)

1-2-5-1- Origine et distribution

Le Bayoud causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (FOA) est une maladie très importante touchant le palmier dattier, elle sévit uniquement en Afrique du Nord, dans toutes les grandes palmeraies du Maroc (sauf Ouarzazate et Marrakech) et dans la plupart de celles du centre, de l'Ouest et du Sud-Ouest de l'Algérie (Fernandez *et al.*, 1995). Le Bayoud est une maladie originaire de la vallée du Draa au Maroc, observée pour la première fois vers 1870 (Fig. 3). Depuis, l'épidémie a progressé vers l'Est et a atteint l'Ouest de l'Algérie en 1898. Son extension s'est poursuivie vers le Sud-Ouest et le Sahara centrale de l'Algérie en 1941. Ensuite, elle s'est propagée dans les palmeraies du centre de l'Algérie, atteignant Metlili en 1950, la région du M'zab (Ghardaia) en 1965, El Atteuf en 1967, et El Ménée en 1978 mais la maladie est éradiquée de cette oasis (Bahris et Bouras, 2020). La maladie est découverte aussi dans les palmeraies mauritaniennes à Adrar et à Tagant respectivement en 1995 et 2002 (Sedra, 2003). Il existe aussi d'autres contaminations dans les palmeraies de l'Ouest Algérien comme la région de Mansoura dans la province de Mzab en 2013, les régions de Moghel et d'Ouled Khedir dans la province de Saoura en 2016 (Benzohra *et al.*, 2017). La diffusion continue du Bayoud, met en évidence le problème menaçant, en particulier, les importantes plantations de Deglet Nour à Oued Rhig et les Zibans en Algérie. Cette maladie mortelle ne s'est pas encore propagée en Tunisie mais, en raison du mouvement sans fin des personnes et des

marchandises à destination et en provenance du pays, la possibilité de transfert de maladies reste un risque pour les cultivars de palmiers dattiers dans ce pays (FAO, 2017).

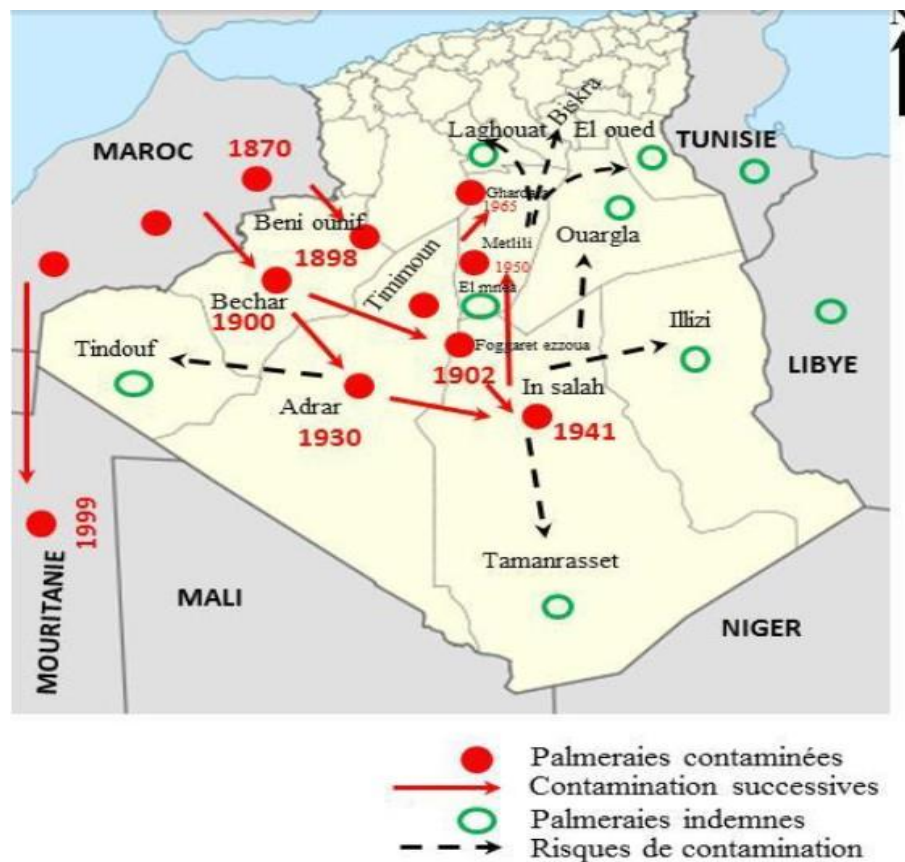


Fig. 3 : Distribution géographique du Bayoud dans le Nord de l’Afrique (Bahriss et Bouras, 2020).

1-2-5-2- Impacts économiques

Le palmier dattier est l'hôte principal du FOA. Ce dernier affecte les différents stades de croissance du palmier dattier, en attaquant aussi bien les palmiers matures que les plus jeunes et même les rejets (Sghir *et al.*, 2016). La fusariose vasculaire a entraîné une destruction de plus de 12 millions de palmiers au Maroc et plus de 3 millions en Algérie (Benzohra *et al.*, 2015) incluant surtout les variétés et les cultivars vigoureux et productifs des meilleures variétés commerciales, comme Medjool et Deglet nour. Les zones qui comptaient autrefois 300 à 400 palmiers par hectare ont été réduites à 5 à 10 palmiers par hectare. Cette catastrophe a eu des effets négatifs sur les agriculteurs des zones touchées en créant des problèmes sociaux-économiques dû au fait qu'ils quittaient leurs terres et

perdaient leur principale source de revenus (Abdullah *et al.*, 2010). En outre, le Bayoud a non seulement entraîné une érosion génétique dans la population hôte mais aussi une accélération du phénomène de désertification de l'écosystème oasis notamment la disparition des cultures céréalières, fourragères, végétales et d'arbres fruitiers sous-jacentes (El Modafar, 2010). Devant cette situation alarmante de l'extension de la maladie et vu l'importance des dégâts occasionnés, le Bayoud est un ennemi majeur de la culture du palmier dattier dans le monde (Benzohra *et al.*, 2015).

1-2-5-3- Symptomatologie du Bayoud

Le premier symptôme extérieur, traduisant l'existence de la maladie sur un palmier dattier, est l'aspect plombé que prend une palme de la couronne moyenne de l'arbre. Ce symptôme est discret et il faut un observateur exercé pour le déceler.

Les premiers symptômes de la maladie apparaissent sur une ou plusieurs feuilles de la couronne médiane caractérisés par un dessèchement et un blanchiment unilatéral progressif du bas vers le haut atteignant les épines et les folioles (Fig. 4A). Les feuilles affectées présentent une teinte plombée puis se fanent de la base au sommet. Ce symptôme est à l'origine du nom de la maladie, Bayoud dérivant du mot arabe « abyed » qui veut dire blanc (Bahris et Bouras, 2020). Les pennes d'un côté de la feuille deviennent blanches puis la maladie progresse de la base vers l'apex. Après qu'une face est affectée, le blanchiment commence de l'autre face, progressant cette fois du haut de la feuille vers la base, jusqu'à ce que la feuille entière meure. Correspondant au passage du mycélium dans les vaisseaux du rachis, une tache brune apparaît dans le sens de la longueur sur la face dorsale du rachis et progresse de la base jusqu'à l'extrémité de la fronde. Ensuite, la feuille apparaît arquée, ressemblant à une plume mouillée et pend le long du tronc. Ensuite les palmes voisines sont atteintes à leur tour et la maladie progresse vers le bourgeon terminal qui finit par la mort de l'arbre (Fig.4B). Le processus de blanchiment et de mort des pennes peut prendre quelques jours à plusieurs semaines. La mort du palmier peut intervenir de 6 semaines à 2 ans après l'apparition des premiers symptômes selon le cultivar et les conditions de plantation. Cependant, les palmiers peuvent mourir en 1 mois ou persister pendant 10 ans ou plus. (Louvet *et al.*, 1970 ; Djerbi,1982 ; Fernandez *et al.*, 1995). A l'intérieur, le déracinement d'un palmier dattier malade permet d'observer un nombre réduit de racines malades rougeâtres, elles représentent la porte d'entrée du champignon. De plus, des coupes transversales au niveau du tronc, mettent en évidence une coloration brun rougeâtre des vaisseaux conducteurs, témoignant le passage du champignon le long du stipe (OEPP,

1994). Les frondes qui manifestent des symptômes externes ont une couleur brun rougeâtre et des faisceaux vasculaires très colorés quand on les coupe. Il y a donc continuité des symptômes vasculaires qui existent depuis les racines jusqu'aux feuilles apicales du palmier. Les symptômes n'ont jamais été signalés sur les pédoncules, les fleurs ou les fruits (Koulla et Saaidi, 1985).

Ces symptômes sont dits typiques, mais parfois on assiste à des symptômes atypiques, caractérisés par l'absence de la strie brune longitudinale sur le rachis, le dessèchement des palmes se fait sur les deux côtés à la fois. Dans tous les cas les vaisseaux conducteurs des palmes consultés présentent des nécroses (Bahris et Bouras, 2020).



Fig. 4 : (A) Premiers symptômes du Bayoud, (B) Stade final de la maladie (Hakkou *et al.*, 2012).

1-3- Agent pathogène : *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*

1-3-1- Historique et Taxonomie du genre *Fusarium*

Le genre *Fusarium* est un groupe diversifié de champignons imparfaits filamenteux qui comprend à la fois des agents pathogènes des plantes et des espèces susceptibles de provoquer des maladies chez les humains et les animaux. Le nom *Fusarium* donné à ce champignon dérive du nom latin « fusus » car ses spores sont en forme de fuseau. La première description du genre *Fusarium* a été réalisée par Link en 1809, ce dernier a créé le genre pour des espèces présentant des spores cloisonnées fusiformes formées sur des stromas. En 1935 Wollenweber et Reinking ont regroupé les *Fusarium* dans 65 espèces 55 variétés et 22 formes basées sur des différences morphologiques qui semblent être parfois

très faibles et variables. Synder et Hansen ont réduit le nombre de *Fusarium* à neuf. Leur identification était basée sur l'utilisation de cultures dérivées de spores uniques. Entre 1940 et 1980, plusieurs mycologues ont développé différentes taxonomies du *Fusarium*, mais aucune d'entre elles n'a fait l'objet d'un accord mondial. Au cours des années 1980, les taxonomistes du *Fusarium* du monde entier ont collaboré pour proposer un accord unique sur cette taxonomie. La taxonomie de *Fusarium* est traditionnellement basée sur les caractéristiques morphologiques, mais avec les progrès des techniques moléculaires, il y a eu une reclassification significative des espèces au sein de ce genre. Cette relative uniformité a encore radicalement changé au cours des années 1990 avec l'application du concept d'espèce phylogénétique selon les séquences d'ADN des gènes diagnostiqués. Toutefois, l'introduction de nouvelles espèces de *Fusarium* selon ce concept est souvent impossible à distinguer morphologiquement. Par la suite, les travaux de Leslie et Summerell (2006), ont intégré les concepts morphologiques, biologiques et phylogénétiques des espèces pour décrire 70 espèces de *Fusarium*. Cette classification est largement utilisée par les mycologues et les phytopathologistes pour identifier les isolats de *Fusarium*.

1-3-2- L'espèce *Fusarium oxysporum*

Le genre *Fusarium* rassemble de nombreuses espèces phytopathogènes dont le *Fusarium oxysporum* qui est l'espèce parasite la plus fréquente et la plus importante de la microflore fongique des sols. *F. oxysporum* est un complexe d'espèces qui englobe des souches génétiquement et phénotypiquement variées et est trouvé dans une large gamme d'écosystèmes (Armstrong et Armstrong, 1981). *F. oxysporum* est un saprophyte commun du sol qui infecte un large éventail d'espèces végétales à travers le monde et engendre le flétrissement vasculaire mortel chez les plantes. La communauté internationale des pathologistes fongiques, a classé le *F. oxysporum* en cinquième position dans une liste des dix champignons les plus pathogènes des plantes, basés sur les importances économiques engendrées (Dean *et al.*, 2012). *F. oxysporum* est l'un des organismes fongiques importants retrouvé sur les terres cultivées. Il représente 40 à 70 % de toute la flore fusarienne. Il est représenté par plusieurs formes diversifiées en termes de morphologie et de physiologie. Ces formes sont des saprophytes ou parasites de nombreuses plantes et représentent différents niveaux de virulence. L'espèce *F. oxysporum* comprend plus de 120 souches connues ou « formes spéciales », dont chacune est spécifique à un hôte végétal unique dans

lequel elle provoque la maladie. Ces formes sont morphologiquement identiques mais ont des spécificités parasitaires très étroites (Armstrong et Armstrong, 1981).

1-3-3- La Forme spéciale : *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*

Parmi les formes spéciales de *F. oxysporum*, on distingue « *albedinis* », le parasite responsable du Bayoud appelé *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. Il a été isolé pour la première fois en 1921, et identifié seulement en 1934 par Malençon. L'hôte principal du FOA est le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) (Hakkou *et al.*, 2012).

1-3-3-1- Position taxonomique

La classification taxonomique de l'espèce FOA est la suivante :

Règne : Fungi.

Division : Ascomycota.

Classe : Sordariomycetes.

Ordre : Hypocreales.

Famille : Nectriaceae.

Genre: *Fusarium*.

Espèce: *Fusarium oxysporum*.

Sous-espèce: *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Killian et Maire) Gordon et Malençon

1-3-3-2- Caractéristiques morphologiques et culturales

Le FOA peut être observée sur milieu PDA (gélose à la pomme de terre et au dextrose) à partir d'un fragment de rachis de palme présentant des symptômes de fusariose vasculaire (Sedra et Djerbi, 1985). L'isolement du FOA se fait sur des milieux de culture usuels tels que PDA et Czapek-Dox où le champignon présente un aspect cultural dans plus de 80% des cas appelé forme sauvage ou forme typique du parasite. Son aspect macroscopique est caractérisé par un tapis mycélien cloisonné à croissance lente (6 à 8,5 cm de diamètre en 8 jours à 25°C) (Hakkou *et al.*, 2012). Ce dernier est fin frisé et régulier dans les jeunes cultures au sein duquel se forment des petites sporodochies roses-saumon et présente en culture âgées des cellules hypertrophiées en chaîne d'aspect globuleux rappelant des chlamydospores. Les cultures ont une apparence visqueuse due à la production abondante des conidies (EPPO, 2003) (Fig. 5). Les cultures fraîches du FOA apparaissent rose saumon (OEPP, 1994 ; Abdullah *et al.*, 2010) mais deviennent rose, pourpre, pêche ou

violet lorsque les cultures sont maintenues sur milieu synthétique par transferts d'inoculum massifs (OEPP, 1994). Il a été rapporté que le type de colonie d'origine du FOA notamment appelé type sauvage est très difficile à préserver. En effet la forme sauvage présente des caractéristiques culturelles très instables dans des conditions normales et produit rapidement des mutants (Benzohra *et al.*, 2015). La température de croissance optimale du pathogène se situe entre 21 et 27,5°C mais une meilleure croissance du mycélium se produit à 28°C. Au-delà de 37°C aucune croissance ne s'effectue. Le développement du champignon reste lent de 7 jusqu'à 12 jour (Benzohra *et al.*, 2015).



Fig. 5 : Culture du FOA sur différents milieux de culture.

L'aspect microscopique du FOA montre un mycélium hyalin et cloisonné. La reproduction asexuée se réalise par des microphialides et des macrophialides (Fig.6), les microphialides en forme enflées à la base et pointues à l'extrémité sont implantées perpendiculairement sur le mycélium et produisent d'une manière endogène plusieurs microconidies. Ces dernières, sont généralement unicellulaires, parfois bicellulaires, hyalines, globuleuses ou allongées avec des dimensions variables dans une même culture (3-15 x 3-5 µm). Les macrophialides, beaucoup plus grandes que les microphialides, forment des macroconidies à base pédiforme et extrémités courtes et pointues, peu nombreuses, souvent triseptées, bien que certaines ont quatre ou cinq cloisons et mesure 20 à 30 x 3 à 5 µm. Dans les cultures âgées et dans le sol, le FOA forme des chlamydoconidies uniformes et sphériques, avec une paroi lisse et épaisse variant de 6 à 20 µm. Ils peuvent être soit intercalaires, soit terminales, isolés ou regroupés en deux ou quatre chaînes courtes. Les chlamydoconidies sont formées soit sur le mycélium soit à partir des macroconidies (Sedra et Djerbi, 1985). Fréquemment, le pathogène produit des sclérotes, bleu sombre à noir, de 1 à 2 mm de diamètre, soit distribué sur la surface mycélienne, soit groupés (Abdullah *et al.*, 2010).

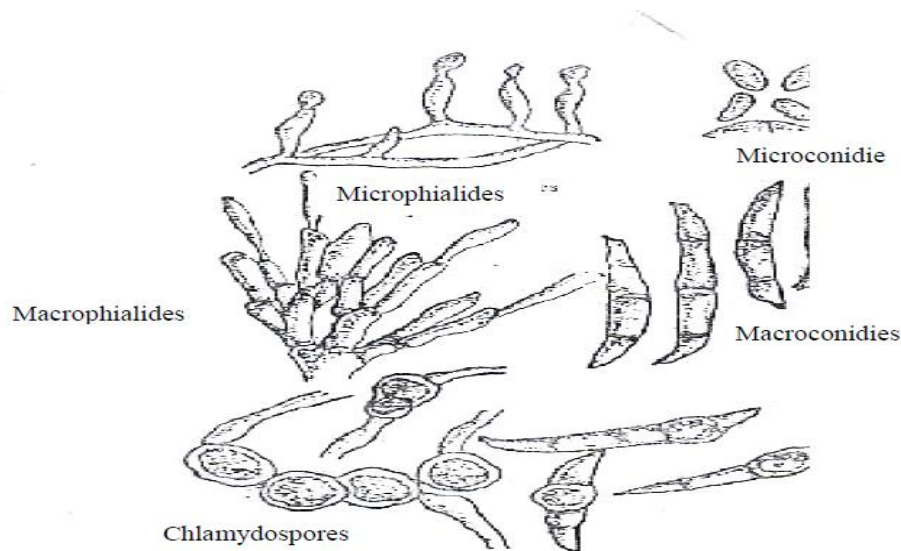


Fig. 6 : Caractéristiques microscopiques de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Benzohra *et al.*, 2015).

1-3-3-3- Epidémiologie et cycle biologique du FOA

Le FOA peut survivre dans le sol et sur des débris végétaux pendant plusieurs années en l'absence de son hôte. On le retrouve en faibles quantités jusqu'à 1 m de profondeur (10-75 propagules par gramme de sol), avec une répartition très hétérogène. De petits nombres de germes (quelques dizaines par gramme de sol) ou une faible proportion de spores de FOA dans le sol suffisent à provoquer le Bayoud. A l'échelle d'un foyer, le Bayoud se propage de façon radiale ; il semble que la maladie puisse se transmettre par contact racinaire entre palmiers. L'irrigation favorise aussi le développement de la maladie, les cultures associées peuvent aussi contribuer à maintenir la population du FOA dans le sol. Le henné (*Lawsonia inermis* L.) et la luzerne (*Medicago sativa* L.), souvent cultivés parmi les palmiers dattiers, sont des porteurs asymptomatiques du champignon. La dissémination d'une palmeraie à l'autre est due essentiellement au transport de rejets de palmiers ou de fragments (bois, palmes) hébergeant le champignon (OEPP, 1994).

L'évolution de la maladie dans un palmier peut-être plus ou moins rapide selon la variété, selon la façon dont la contamination s'est produite sur les racines et selon les facteurs extérieurs qui conditionnent la végétation. D'autre part, le temps s'écoule entre la contamination des racines et l'apparition des premiers symptômes sur les palmes ne peut être défini. La mort des arbres est très influencée par les conditions de culture. Il est donc certain que les meilleures conditions de végétation des palmiers sont également les conditions les plus favorables à une mort rapide des arbres. Le Bayoud n'est donc pas une

maladie de faiblesse. L'irrigation est particulièrement importante : si elle est abondante la circulation de la sève est plus rapide, ce qui accélère le transport des spores du champignon dans les vaisseaux et le développement des phénomènes maladifs. Mais des facteurs autres que la transmission potentielle du parasite semble être nécessaires à l'établissement du Bayoud. Ainsi, certains sols de palmeraie empêchent l'établissement du champignon dans le sol et/ou l'expression de son pouvoir pathogène. Des recherches ont montré que cette résistance est d'origine biologique. En effet, une compétition microbienne pourrait conditionner la réceptivité du sol (Fernandez *et al.*, 1995).

1-3-3-4- Cycle infectieux du FOA

Le FOA démarre son cycle de développement en affectant le système racinaire de l'hôte. Le pathogène existant dans les tissus de palmiers malades se libère lors de la désintégration de ces tissus. Les chlamydospores libérés dans le sol demeurent à l'état dormant. Dès que les conditions deviennent favorables, les spores germent en réponse aux signaux de la plante hôte et se différencient sous forme de hyphes d'infection, qui adhèrent aux racines des plantes et pénètrent directement sans avoir recours à des structures d'infection spécialisées. La pénétration des racines semble se produire principalement par les ouvertures naturelles au niveau des jonctions intercellulaires des cellules corticales ou par des blessures (Perez-Nadales *et al.*, 2014). Une fois que le mycélium pénètre dans la racine, il croît de façon dirigée vers les tissus vasculaires à partir desquels il atteint la tige (Fig.7). Il progresse toujours de bas en haut à travers le stipe vers le bouquet foliaire, en suivant le chemin parcouru par certains vaisseaux. Une fois à l'intérieur de la racine, les hyphes se développent de manière inter et intracellulaire pour envahir le cortex et traverser l'endoderme, jusqu'à atteindre les vaisseaux du xylème. Le champignon utilise ensuite le xylème comme conduit pour coloniser l'hôte (Michielse et Rep, 2009). Dans les vaisseaux, le mycélium produit des microconidies qui sont transportées vers le haut par la sève. Quand ce mouvement est empêché par une paroi transversale, les microconidies germent. Le tube germinatif pénètre dans la paroi et la formation de microconidies reprend de l'autre côté de la paroi. La mort de l'arbre survient lorsque le champignon atteint le bourgeon terminal (Abdullah *et al.*, 2010).

Au cours de sa progression, le FOA s'échappe du xylème et colonise le parenchyme environnant par un mycélium inter et intracellulaire, c'est ce qui donne plus tard la coloration brun rougeâtre caractéristique des arbres malades. Après la mort de l'arbre, le

mycélium continue à se développer dans les tissus morts et forme de nombreuses chlamydo-spores dans les cellules du sclérenchyme.

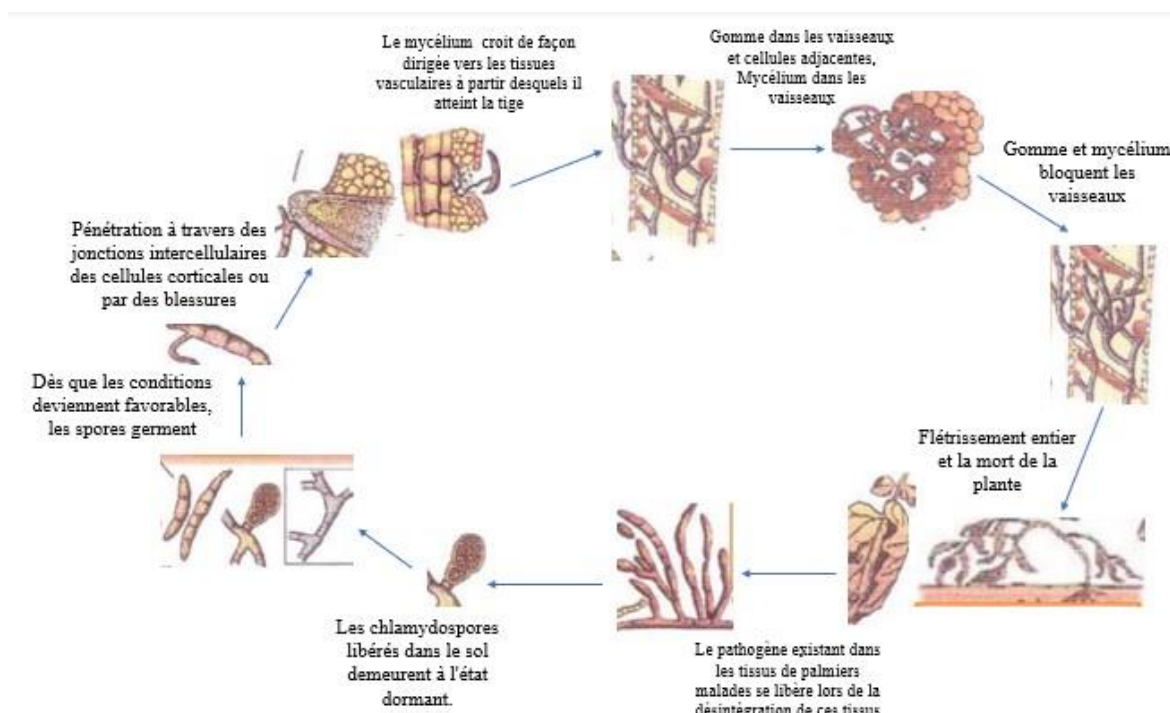


Fig. 7 : Cycle infectieux du FOA (Agrios, 2005).

1-3-3-5- Mécanismes de virulence du FOA

Au cours du processus d'infection, *F. oxysporum* utilise un certain nombre de systèmes de sécrétion et déclenche une variété de facteurs de virulence, tels que des mycotoxines, des protéines effectrices et des enzymes dégradant la paroi cellulaire végétale (Zuriegat *et al.*, 2021).

De nombreuses expériences ont montré le pouvoir phytotoxigène du FOA. Comme toutes les autres espèces pathogènes de *F. oxysporum*, le FOA sécrète dans son milieu de culture liquide de nombreuses substances, notamment de l'acide fusarique de la beauvéricine, et des fumonisines, qui contribuent à la pathogénicité chez les hôtes. Les formes spéciales de *F. oxysporum* produisent divers composés peptidiques, terpéniques, polysaccharidiques ou glycopeptidiques et également des phytotoxines (Sedra et Lazrek, 2011). Les phytotoxines produites par les souches agressives de FOA comprennent l'acide fusarique, succinique, 3-phényl-lactique et phénylacétique (Oubraim *et al.*, 2016).

Dans son filtrat de culture, le FOA produit trois types de fraction de toxines FI, FII et FIII. Toutes ces fractions ont un pouvoir phytotoxigène pour le palmier dattier, mais la

fraction FII s'est révélée la plus importante et la plus toxique. En effet, cette toxine est thermostable et l'analyse par HPLC montre qu'elle contient une grande proportion d'acide fusarique et d'autres sous fractions H(3), H(4), H(5) et H(6). Il a été signalé que l'acide fusarique joue un rôle très important dans le stade précoce de l'infection du palmier dattier par le FOA (Sedra et Lazrek, 2011), sans négliger son influence sur la réduction de la quantité de la chlorophylle et l'inhibition de la photosynthèse (Oubraim *et al.*, 2016). D'autre part, les sous fractions H(4), H(5) et H(6) provoquent l'apparition des symptômes du Bayoud au niveau des feuilles et des racines. Ces substances ne sont produites que par les souches agressives de FOA.

La virulence des souches de FOA est liée aussi aux enzymes tels que les polygalacturonases, les pectate lyases, les xylanases et les cutinases, qui peuvent contribuer à la pathogénèse en dégradant les cires, les cuticules et les parois cellulaires pour induire une invasion tissulaire et une dispersion des agents pathogènes provoquant la mort du dattier (Fernandez *et al.*, 1995 ; Amraoui *et al.*, 2004). La sécrétion de protéine suppresseur qui supprime le déclenchement des mécanismes de défense chez les cultivars sensibles est un autre facteur de virulence qui est détecté chez le FOA (El Modafar, 2010).

1-3-4- Mécanismes de défense et de résistance du palmier dattier

La résistance du palmier dattier à la maladie du Bayoud est liée à des mécanismes de défense multifactorielle, dont certains sont constitutives (l'acide caféoylshikimique, la lignine, les phénols liés aux parois cellulaires) et d'autres sont induits de novo (les phytoalexines, protéines PR, thylls). En fonction de leur rôle dans la stratégie de défense de la plante hôte, ces mécanismes peuvent être classés en deux types : mécanismes mécaniques comme le renforcement des parois cellulaires par la lignine et les phénols pariétaux, ce type de stratégie limite l'action hydrolytique des enzymes secrétées par le FOA lors de la dégradation de la paroi cellulaire de l'hôte (El Modafar, 2010).

Cependant, les protéines de défense, phytoalexines, acides caféoylshikimiques et l'accumulation des dérivés de la coumarine (propyl-7-aesculetin, l'hydroxy-5-propyl-7-aesculetin) sont des mécanismes chimiques dont le rôle est d'inhiber la croissance du FOA et d'empêcher la synthèse de ses enzymes hydrolytiques (pectinolytiques, cellulolytiques et protéolytiques) (El Modafar, 2010). Il a été décrit que les racines des cultivars résistants se sont avérées plus riches en acides caféoylshikimiques que les racines des cultivars sensibles. L'acide caféoylshikimique accumulé en quantité importante dans les cultivars résistants inhibe la croissance et la conidiogénèse du FOA, tandis que les faibles

concentrations accumulées dans les cultivars sensibles n'ont aucun effet (Zitouni *et al.*, 1996).

Les composés phénoliques pariétaux peuvent agir directement comme des molécules de défense, mais aussi comme des précurseurs de la lignine. Les acides benzoïque et cinnamique qui sont considérées comme des phénols pariétaux, jouent un rôle important dans la défense lors de l'attaque parasitaire chez les cultivars résistants (Boucenna-Mouzali *et al.*, 2017).

Le métabolisme phénolique du palmier dattier dépend de l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL). Il a été montré que la différence d'induction des réactions de défense du palmier dattier en réponse à l'infection par le pathogène est liée à une différence d'induction de l'activité PAL. Cette différence pourrait être liée à une suppression de l'induction de l'activité PAL par le FOA chez les cultivars sensibles par rapport aux cultivars résistants (El Modafar, 2010). En effet, PAL représente l'enzyme clé dans les réactions de défense, voire le métabolisme des composés phénoliques, des phytoalexines et de la lignine (El Modafar *et al.*, 2001).

1-3-5- Virulence et perception de l'hôte

L'infection vasculaire par *F. oxysporum* nécessite la perception de l'hôte. L'agent pathogène reconnaît les hôtes appropriés, pénètre et envahit les tissus végétaux (Michielse *et al.*, 2009). *Fusarium* spp. perçoit les signaux chimiques et physiques de l'hôte et répond par des changements métaboliques et morphogénétiques appropriés nécessaires au développement du pathogène. En outre, les hydrolases dérivées de l'hôte, y compris les chitinases et les glucanases, libèrent des monomères qui agissent comme des éliciteurs, transmettant un signal au champignon pour la synthèse d'enzymes (cutinases, pectinases, endopolygalacturonases et autres enzymes hydrolytiques) nécessaires à la pénétration chez l'hôte (Woloshuk et Kolattukudy, 1986).

Différentes cascades de signalisation sont activées chez *Fusarium* spp. lors de l'infection de l'hôte. Leur activation dépend principalement de la perception des signaux par différentes protéines réceptrices, généralement à la surface cellulaire qui se lie au signal moléculaire. Les protéines membranaires Msb2 et Sho1 régulent les processus d'infection dans *F. oxysporum* (Fig.8A). Ces protéines contribuent à la virulence de plusieurs manières : ils (i) régulent les gènes codant pour différentes enzymes impliquées dans la biogenèse de la paroi cellulaire, (ii) contribue à la réponse au stress de la paroi cellulaire et (iii) confère les fonctions de virulence dépendantes de Fmk1 (Husaini *et al.*, 2018).

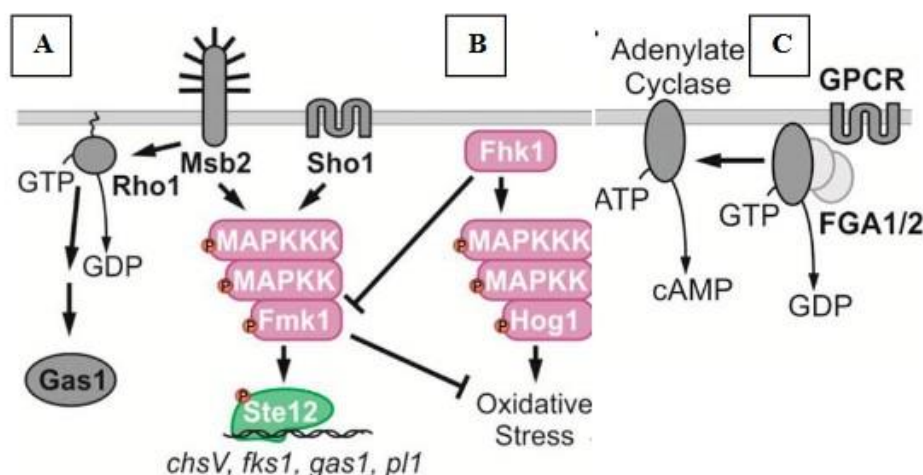


Fig. 8 : Représentation schématique des principaux acteurs du processus infectieux de *F. oxysporum* (Husaini *et al.*, 2018).

Segorbe *et al.* (2017) ont analysé génétiquement les contributions individuelles et combinées des trois protéines MAPK (mitogen-activated protein kinase) Fmk1, Mpk1 et Hog1 dans la régulation du développement, de la réponse au stress et de la virulence de *F. oxysporum*. Néanmoins, les mutants dépourvus de Fmk1 ou de Mpk1 ont été affectés par l'homéostasie des espèces réactives à l'oxygène (ROS) et altérés par la fusion et l'agrégation des hyphes. D'un autre côté, la GTPase Rho1 de type RHO de *Fusarium* spp. est nécessaire pour le bon assemblage de la paroi cellulaire et pour la virulence (Fig.8A). Rho1 régule positivement l'activité post-traductionnelle de la glucane synthase et joue un rôle important dans le maintien de l'architecture hyphale, ce qui empêche sa détection par l'hôte (Husaini *et al.*, 2018).

Les MPK jouent un rôle fondamental dans la détermination de la virulence de *F. oxysporum*. MPK Fmk1, appartenant à la sous-famille des kinases est indispensable à la virulence de *F. oxysporum*. Fmk1 (Fig.8A,B) est un composant important de la voie de transduction du signal qui régule divers processus d'infection de *F. oxysporum* telles que l'adhérence du pathogène aux racines de l'hôte, formation d'hyphes d'infection, fixation et pénétration des racines, colonisation vasculaire et croissance invasive sur les tissus végétaux vivants (Di Pietro *et al.*, 2001). L'histidine kinase Fhk1 est un autre élément clé qui contribue à la virulence, au stress oxydatif en recrutant plusieurs voies de signalisation (Fig.8B). Fhk1 régule les événements de l'infection des racines et améliore les symptômes de la maladie (Rispaïl et Di Pietro 2010).

Les protéines de liaison au GTP (protéine G) sont des composants essentiels qui médient les réponses cellulaires aux stimuli environnementaux. Lorsqu'une molécule signal

extracellulaire se lie à un récepteur GPCR couplé à la protéine G, le récepteur subit un changement conformationnel qui lui permet d'activer une protéine trimérique de liaison au GTP (protéine G) permettant de réguler indépendamment différentes molécules effectrices, notamment la phosphodiesterase, la protéine kinase A, l'adénylyl cyclase et les canaux ioniques. La sous-unité G β FvGbb1 régule la biosynthèse des fumonisines et est nécessaire pour induire la production d'éthylène lors de l'infection (Yang *et al.*, 2022) (Fig. 8C).

L'importance des gènes codant pour des facteurs de transcription dans la pathogénicité de *F. oxysporum* est mise en évidence. *Fow2*, *Sge* et *FTF1* sont identifiés respectivement chez *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* et *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. En effet, *Fow2* et *Sge* sont impliqués dans l'attachement et la colonisation superficielle des racines. *FTF1* est un gène multicopie présent uniquement dans les souches hautement virulentes, et transcrit spécifiquement lors des premières phases de l'infection (Michielse et Rep, 2009).

L'existence de gènes R (résistance) majeurs chez les hôtes et les races correspondantes chez *F. oxysporum* a fait naître l'espoir que *F. oxysporum* devrait contenir des gènes d'avirulence correspondant aux gènes R chez les hôtes. Comme par exemple, *SIX1* (sécrété dans le xylème 1) identifié chez *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* code pour une protéine riche en cystéine (Six1) qui a été trouvé dans la sève du xylème de plants de tomates infectés et s'est révélé nécessaire à la résistance aux maladies médiée par le gène *R I-3* (« immunité 3 ») chez les plantes hôtes. Six1 a donc ensuite été renommé Avr3 (Houterman *et al.*, 2008). Avr3 est nécessaire pour une virulence totale et s'exprime spécifiquement lors de l'entrée des racines des plantes ou de l'exposition à des cellules végétales en culture (Michielse et Rep, 2009). Des gènes homologues de *SIX* ont été ainsi identifiés chez d'autres *formae speciales* de *F. oxysporum* (Batson *et al.*, 2021). Cependant, l'identification d'un groupe hautement conservé de gènes *SIX* (*SIX7*, *SIX10* et *SIX12*) est partagée entre *F. oxysporum* sp. *physali* et *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Dans la plupart des formes spéciales séquencées à ce jour, *SIX7*, *SIX10* et *SIX12* sont soit tous présents soit tous absents (Simbaqueba *et al.*, 2018).

1-3-6- Diagnostic et détection du pathogène

Le diagnostic et la détection de formes spécifiques à l'hôte de *F. oxysporum* reposent traditionnellement sur la combinaison de symptômes sur l'hôte et de la présence du champignon dans les tissus atteints. La méthode de diagnostic du FOA consiste à l'isolement et l'identification du champignon à partir de matériel végétal infecté, de

porteurs asymptomatiques et du sol. Les critères micro et macroscopiques, tels que la forme, la taille et le taux de croissance des conidies, sont donc inadéquats pour la détection et l'identification de l'agent pathogène (Sedra, 1994). La confirmation du pouvoir pathogène est réalisée par le test d'inoculation d'isolats fongiques aux racines de jeunes plants de palmiers pour évaluer le pouvoir pathogène du FOA. Cependant, l'application du test d'inoculation reste difficile, principalement en raison du temps qu'il prend car la confirmation du pouvoir pathogène est reconnue par la mort des plantes après 1 à 2 mois (Watson, 1974). L'approche classique est de plus en plus problématique car il peut y avoir plus d'une forme spéciale pour un hôte donné, ainsi que des souches non pathogènes qui sont des habitants communs de la rhizosphère et du sol. Ni les formes spéciales, ni les races pathogènes ne peuvent être distingués par leur morphologie. Unies par une pathogénicité commune pour un hôte donné, les souches appartenant à la même forme spéciale n'ont pas forcément de lien phylogénétique.

Par conséquent, des stratégies alternatives sont utilisées pour déterminer si une souche appartient ou non à une spécialité connue. Les techniques moléculaires ont apporté une nouvelle contribution à l'étude de la diversité génétique de cette espèce mettant en valeur sa phylogénie, son pouvoir pathogène et son identification. L'analyse moléculaire du génome (ADN nucléaire et mitochondrial) de différentes formes spéciales et des formes non pathogènes à l'aide de différentes techniques analytiques (RFLP, RAPD, AFLP, PCR...); a mis en évidence la diversité génétique au sein de l'espèce *F. oxysporum* et à l'intérieur des formes spéciales.

Les techniques d'empreintes moléculaires, notamment les polymorphismes de longueur des fragments de restriction (RFLP) et l'ADN polymorphe amplifié aléatoirement (RAPD), ont montré que l'entité dans la structure de la population de *F. oxysporum* est la lignée clonale d'un seul individu unique (Kistler, 1997 ; Taylor *et al.*, 1999). Ces lignées clonales sont détectées en testant la compatibilité végétative des souches. Les souches capables de s'anastomoser entre elles sont placées dans le même groupe de compatibilité végétative (VCG) (Katan, 1999). Les lignées clonales peuvent également être identifiées par des empreintes digitales uniques RFLP et RAPD (Mes *et al.*, 1994 ; Baayen *et al.*, 1997 ; 1998). Cela a incité au développement de méthodes par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) basées sur les empreintes digitales pour la détection de VCG donnés. En revanche, des amorces de PCR très spécifiques sont développées pour les formes spéciales (ou races) qui se composent d'une seule lignée clonale, et pour les groupes

monophylétiques des lignées à l'intérieur d'une forme spéciale. Des amorces de PCR spécifiques sont ainsi mises au point et peuvent remplacer fiablement les procédures conventionnelles d'isolement et de tests de pouvoir pathogène. Fernandez *et al.* (1998) ont mis au point une paire d'amorces (TL3-FOA28) qui pourrait être utilisée comme sondes spécifiques pour le diagnostic du FOA par PCR pour l'identification rapide de l'agent pathogène. Ce test permet de différencier l'agent pathogène du palmier dattier des autres *F. oxysporum*, ainsi que des souches saprophytes (Hakkou *et al.*, 2012). Une autre paire d'amorce BIO3 et FOA1 est aussi utilisée dans la PCR. Ces types de primer permettent d'amplifier des régions bien déterminées dans l'ADN génomique du FOA. Ce test permet de différencier l'agent pathogène du palmier dattier des autres *F. oxysporum* saprophytes et pathogènes par l'apparition d'une simple bande d'ADN unique et spécifique du FOA (Benlarbi *et al.*, 2018).

Des approches, moléculaires de type RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) permettent d'estimer la proximité génétique des souches. Chez *F. oxysporum*, des travaux récents ont montré que les profils de restriction de l'ADN ribosomique (ADNr) et de l'ADN mitochondrial (ADNmt) permettent de caractériser une variabilité inter et/ou intra-forme spéciale et révèlent des taux de polymorphisme différents selon la spécialisation parasitaire (Kistler *et al.*, 1987). Différents groupes RFLP de l'ADNr sont conduites sur un large échantillon d'isolats de FOA provenant de plusieurs palmeraies marocaines (Tantaoui et Fernandez, 1993). L'étude de la diversité génétique du FOA par l'approche RFLP n'a montré qu'un faible polymorphisme, Ces résultats sont la preuve d'une remarquable homogénéité génétique du champignon malgré la grande diversité des variétés de dattier qu'il peut infecter (Fernandez *et al.*, 1995).

1-3-7- Contrôle de la maladie du Bayoud

Depuis plusieurs années, des recherches ont été menées pour lutter contre le Bayoud, mais jusqu'à présent aucun moyen curatif efficace n'est susceptible d'enrayer la maladie. Les orientations de lutte s'apparentent à celles préconisées contre les autres fusarioses vasculaires connues. Différents moyens de lutte contre le Bayoud sont adoptés.

1-3-7-1- Mesures prophylactiques

Les mesures préventives consistent à empêcher le transfert du matériel végétal contaminé d'une palmeraie infectée à une palmeraie saine (Louvét *et al.*, 1970). En effet l'OEPP (1990) recommande aux pays phoenicicoles d'interdire l'importation du matériel en

provenance des pays infectés. L'Algérie a promulgué une législation sur la quarantaine en 1942 et 1949, et des mesures de quarantaines strictes ont été appliquées au Sahara et en Afrique du Nord couvrant le mouvement des palmiers dattiers et des produits dérivés. Les contrôles phytosanitaires visant à empêcher le transport de matériel végétal contaminé d'une palmeraie atteinte sont assurés par la sensibilisation des agriculteurs ainsi que la prospection des palmeraies par les services de la protection des végétaux (Institut National de la Protection des Végétaux INPV).

Dans le cas de détection précoce d'un nouveau foyer de Bayoud dans une zone saine, l'éradication est le moyen de lutte utilisé. En effet, après la délimitation du foyer avec une marge de sécurité suffisante, les arbres sont arrachés et incinérés sur place, le sol est, par la suite, stérilisé par l'utilisation d'un mélange de bromure de méthyle et de chloropicrine. En effet, le bromure de méthyle possède une forte capacité de pénétration dans le sol et assure une bonne stérilisation (Dubost et Hethener 1968 ; Frederix et Den Brader, 1989). La zone ainsi traitée est clôturée et reste interdite à la culture pendant une longue période.

1-3-7-2- Lutte chimique

La lutte chimique s'avère pratiquement impossible en raison du coût élevé des traitements et des risques encourus. Le seul cas où elle peut être envisagée c'est l'éradication d'un nouveau foyer dans une zone saine. Un essai a déjà été mené à El-Goléa, en 1978, avec succès puisque le Bayoud n'y a pas été rencontré jusqu'à ce jour. Des recherches se poursuivent à l'INPV de Ghardaïa. Divers fongicides ont été testés à action systémique sur des palmiers malades mais aucun résultat probant n'a vu le jour. L'utilisation du bromure de méthyle et de la chloropicrine semble donner de bons résultats (Bounaga et Djerbi., 1990). L'utilisation de fongicides systématiques dans le cas des trachéomycoses sont très limitées car les chlamydospores du FOA sont présentes en profondeur où elles se conservent de nombreuses années (Aberlenc-Bertossi, 2010). En plus, ces produits sont peu stables dans le sol et risquent de favoriser la sélection des souches résistantes. En les utilisant d'une façon répétitive et pendant de longues années, ces produits chimiques risquent de nuire à l'environnement (Hakkou *et al.*, 2012).

1-3-7-3- Solarisation et fumigation

La solarisation du sol (couverture par un film plastique transparent et hermétique) est une technique efficace pour la baisse de la densité des agents pathogènes telluriques et la réduction des maladies. La solarisation du sol a en particulier été rapportée comme moyen

de traitement de pré-plantation pour lutter contre de nombreuses fusarioses vasculaires. Le rôle potentiel de la solarisation dans la lutte contre le FOA a été mis en évidence dans des expérimentations dans les palmeraies du Maroc. La solarisation est très active contre les espèces du genre *Fusarium*, auquel appartient l'agent causal de la fusariose vasculaire du palmier dattier. Cependant, son effet décroît rapidement en profondeur.

La fumigation du sol pourrait aussi contribuer à diminuer le potentiel infectieux du sol. C'est la principale technique utilisée pour éliminer des agents pathogènes telluriques (DeVay, 1998 ; Hwang *et al.*, 2014). Depuis l'interdiction de l'usage du bromure de méthyle pour ses effets sur la couche d'ozone (Duniway, 2002). Le metam sodium est l'un des produits ayant montré une bonne aptitude à contrôler les pathogènes telluriques (Hamm *et al.*, 2003 ; Shachaf *et al.*, 2007 ; Xie *et al.*, 2015). La combinaison de plusieurs techniques peut être un outil important de la lutte intégrée contre les parasites (Katan, 1996). L'association de la fumigation à des doses réduites avec la solarisation ou avec d'autres moyens de lutte améliore l'efficacité des traitements (Essarioui et Sedra, 2017).

1-3-7-4- Pratiques culturelles

Les techniques culturelles consistent à éviter les conditions qui favorisent la croissance du FOA. Étant donné que les facteurs qui favorisent le rendement élevé des dattiers (irrigation, fertilisation, etc.) sont les mêmes que ceux qui favorisent la croissance du champignon. Une réduction significative de la quantité d'irrigation peut retarder l'avancée de l'infection. L'irrigation doit être arrêtée entre les mois de mai et octobre, pendant la saison chaude (Pereau-LeRoy, 1958). Étant donné que la contamination se produit principalement par contact avec les racines, il est possible d'isoler les palmiers exempts de maladie en creusant une tranchée de 2 m de profondeur autour d'eux. L'eau doit être fournie par un bac reliant le reste du bosquet à cette parcelle isolée. Dans ces conditions, ces palmiers peuvent être protégés pendant plus de 10 ans (Djerbi, 1983). Ainsi, il est nécessaire de ne pas cultiver en palmeraie des plantes susceptibles d'être des porteurs sains (Louvet *et al.*, 1970).

1-3-7-5- Contrôle génétique

L'utilisation des variétés résistantes du palmier est le moyen le plus privilégié pour lutter contre cette maladie. La diffusion des variétés résistantes existantes est très limitée du fait de la qualité médiocre des dattes. Les recherches entreprises en matière d'amélioration génétique ont permis la sélection des cultivars et des clones alliant à la fois la qualité du

fruit et la résistance au Bayoud (Sedra, 2005). Parmi les 32 variétés marocaines testées dans les stations expérimentales, seules six variétés ont montré une résistance totale au FOA. Malheureusement, toutes ces variétés ont une qualité dattière faible, ce qui constitue un handicap à leur transplantation à grande échelle. (Hakkou *et al.*, 2012). Les meilleures variétés de dattes cultivées actuellement (Deglet Nour, Mejhoul, Hallawy ...) restent toujours des clones très anciens qui ne proviennent certainement pas à l'origine d'hybridations contrôlées, mais de croisements naturels (Saaidi, 1990).

La lutte génétique se poursuit au Maroc et en Algérie dans les stations de recherches agronomiques. Des cultivars d'autres pays sont aussi introduits dans ces essais puisque les palmiers du Maroc qui étaient résistants se sont avérés sensibles 8 à 10 ans après leurs plantations (Bounaga et Djerbi, 1990). De plus, le succès actuel de la propagation du palmier dattier par culture *in vitro* permettra de réhabiliter les palmeraies détruites par le Bayoud. Il sera également possible de reconstituer les palmeraies actuellement menacées et de créer de nouvelles zones de culture à l'aide de variétés résistantes de haute qualité. (Benzohra *et al.*, 2015).

1-3-7-6- Contrôle biologique

La prospection dans les sols des palmeraies, de microorganismes ayant des effets antagonistes envers le FOA est une voie de plus en plus explorée. En effet, des travaux ont abouti à l'isolement de microorganismes impliqués dans les mécanismes de résistance des sols afin de les utiliser dans la lutte biologique contre des agents phytopathogènes (Khene *et al.*, 2017). Plusieurs chercheurs se sont intéressés aux micro-organismes antagonistes tels que les bactéries, les champignons et les actinomycètes, dans l'espoir de mettre au point un procédé de lutte efficace capable de limiter la gravité des fusarioses. La stratégie de lutte *via* l'utilisation des microorganismes est appuyée par l'existence de sols répressifs empêchant le développement de la maladie du Bayoud (Sedra et Rouxel, 1989 ; Oihabi *et al.*, 1992). Cette répression est attribuée aux microorganismes antagonistes du FOA. La recherche des sols suppressifs de la maladie de Bayoud constitue une alternative qui a fait l'objet de nombreuses études (Djerbi, 1988). La nature suppressive de certains sols est liée à un antagonisme microbien envers FOA par des bactéries du genre *Pseudomonas* (Maslouhy, 1989), *Bacillus* (Chakroune *et al.*, 2008), d'actinomycètes (Amir et Sabaou, 1983) et de champignons comme *Aspergillus*, *Penicillium* (Chakroune *et al.*, 2008) et des espèces saprophytes de *Fusarium* (Kaur *et al.*, 2011). D'autres BCA appartenant aux genres *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Sporidesmium*, *Burkholderia*, *Serratia* confèrent un

certain niveau de protection contre les agents pathogènes du sol (El Hassni *et al.*, 2007). Plus récemment, d'autres genres bactériens (*Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acetobacter* sp. et *Enterococcus* sp.) ont manifesté des effets variables d'antagonisme vis-à-vis du FOA (Khene *et al.*, 2017).

La mycorhization du palmier dattier est un autre moyen de lutte biologique très important. Il est rapporté que l'inoculation des plantes par les champignons mycorhiziens à arbuscule réduit la gravité de la maladie du Bayoud et stimule la croissance des plantes en augmentant la biomasse et le nombre de feuilles par plante (Jaiti *et al.*, 2007). Ces modalités de lutte sont susceptibles d'induire les réactions de défense du palmier dattier contre son pathogène et pourraient constituer une alternative efficace et non polluante de contrôle de la maladie de Bayoud.

1-4- Gestion de la fusariose par le contrôle biologique

Actuellement, l'intérêt pour le contrôle biologique des agents pathogènes des plantes a considérablement augmenté, en raison de la nécessité d'introduire des alternatives plus respectueuses de l'environnement à l'utilisation de produits conventionnels (Yuan *et al.*, 2012). Les produits microbiens dominent actuellement le marché du BCA. Il est établi que les organismes de lutte biologique sont les ennemis naturels des agents pathogènes des plantes. Dans ce concept les bactéries vivant naturellement en étroite association avec les plantes et appelées bactéries favorisant la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Bacteria : PGPB), sont utilisées comme BCA contre les agents pathogènes des plantes (Savary *et al.*, 2019). Les PGPB sont les membres importants du microbiome et constituent un groupe diversifié de bactéries isolées de la rhizosphère et appartenant principalement aux genres *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Paenibacillus*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Rhodococcus*, *Rhizobium* et *Bacillus* (Backer *et al.*, 2018). Les espèces de *Bacillus* sont préférées et sont considérées comme les BCA les plus efficaces et les plus respectueuses de l'environnement en raison de leur innocuité, de leur viabilité dans des environnements difficiles grâce à la formation d'endospores résistantes au stress, de biofilms et de leur capacité à produire une large gamme de composés antimicrobiens (Poulaki *et al.*, 2023). Comme d'autres PGPB, les *Bacillus* spp. peuvent améliorer la croissance des plantes par la fixation de l'azote, la solubilisation du phosphate, la production de phytohormones ou en atténuant l'impact de certains facteurs de stress abiotiques (Kumar *et al.*, 2011 ; Saxena *et al.*, 2020).

1-4-1- Mécanismes de biocontrôle par *Bacillus*

Bacillus spp. est un groupe phénotypiquement et génotypiquement hétérogène de bactéries Gram-positives formant des endospores et l'un des genres les plus communs trouvés dans divers environnements (Jain *et al.*, 2019). Plusieurs espèces de *Bacillus* ont été identifiées comme PGPB et/ou BCA (Etesami *et al.*, 2023). Leur utilisation intensive sur plusieurs cultures est basée sur leurs caractéristiques exceptionnelles telles que leur tolérance accrue aux conditions de stress, leur capacité à former des endospores, la grande capacité de colonisation racinaire et le grand nombre de métabolites secondaires qu'ils produisent, leur conférant un potentiel de contrôle biologique (Samaras *et al.*, 2021). La suppression des agents pathogènes des plantes par *Bacillus* implique divers mécanismes tels que la production d'antibiotiques, d'enzymes lytiques, la compétition pour les nutriments et l'espace, la production de sidérophores et l'induction de la résistance systémique (Fig.9) (Tab.2) (Beneduzi *et al.*, 2012).

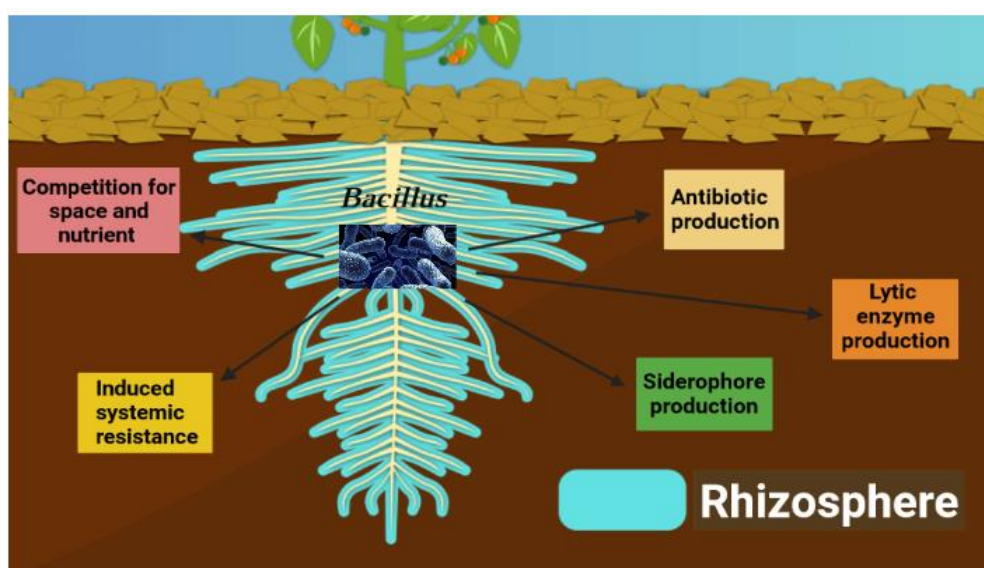


Fig. 9 : Mécanismes de biocontrôle des *Bacillus*

1-4-1-1- Production d'antibiotiques

L'antibiose est un processus biologique qui repose sur la libération de métabolites secondaires antimicrobiens par des BCA pour conférer une protection contre les maladies causées par des agents phytopathogènes (Latha *et al.*, 2019). L'activité de lutte biologique de *Bacillus* spp. est principalement liée à leur capacité à produire une large gamme de composés chimiquement divers. *Bacillus* spp. produisent une vaste gamme de métabolites secondaires, notamment des composés organiques volatiles et non volatiles. Il a été

rapporté que la partie du génome impliquée dans la synthèse de composés antimicrobiens et d'autres métabolites secondaires bioactifs représente 4,5 à 15,4 % de l'ensemble du génome, selon l'espèce et la souche (Dimkić *et al.*, 2022).

La production de métabolites secondaires par *Bacillus* spp. possédant des propriétés antibiotiques est principalement attribué à des peptides de faible poids moléculaire produits par des processus ribosomiques (tels que les bactériocines) ou non ribosomiques (tels que les lipopeptides cycliques, les petits peptides et les polycétides) (Miljaković *et al.*, 2020).

Le principal type d'antibiotiques peptidiques non ribosomiques sont les lipopeptides cycliques synthétisés par des peptides synthétases non ribosomiques (NRPS) des grands complexes multi-enzymatiques. Ils sont connus pour leur activité antagoniste contre un large éventail de phytopathogènes (Wang *et al.*, 2018 ; Luo *et al.*, 2015). Les lipopeptides cycliques les plus importants et les plus étudiés chez *Bacillus* spp. appartiennent, de par leur structure chimique, aux familles des iturines, des fengycines et des surfactines (Wang *et al.*, 2018). Ces lipopeptides cycliques agissent en perturbant la perméabilité et la structure de la membrane cellulaire des pathogènes. Ils peuvent également interagir au sein des cellules en perturbant l'ADN (Fira *et al.*, 2018 ; Zhang *et al.*, 2013).

En revanche, les fengycines et les iturines sont mieux caractérisées pour leurs activités antifongiques contre un large éventail d'agents phytopathogènes. Cela est principalement dû à leur capacité à perturber l'intégrité de la membrane cellulaire fongique, entraînant une fuite du cytoplasme et finalement la mort des hyphes avec inhibition de la germination des spores (Andrić *et al.*, 2020). Les bacillomycines font partie des iturines les plus connues pour leurs activités antifongiques. En effet, *B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens* synthétisent respectivement les bacillomycines L et les bacillomycines D, qui ont montré des activités antifongiques contre divers champignons phytopathogènes (Kaspar *et al.*, 2019). Zhao *et al.* (2014) ont démontré que les lipopeptides synthétisés par *B. amyloliquefaciens* Q-426 (bacillomycine D, fengycine A et fengycine B), sont responsables de l'inhibition de la croissance de *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*.

La fengycine de *B. velezensis* a permis une meilleure inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium* que les fongicides chimiques, et son activité est restée stable même à des températures élevées et à un pH faible. Il a été rapporté que la fengycine augmente la perméabilité et le gonflement des membranes mycéliennes avec une accumulation de chitine et d'acides nucléiques sur le côté gonflé (Xu *et al.*, 2022).

Les fengycines présentent une activité antagoniste contre un large éventail de cibles fongiques, mais pas contre les bactéries et les levures. Cependant les surfactines sont

fortement antifongiques et antibactériennes. Les surfactines et les fengycines sont des éliciteurs de résistance systémique induite chez les plantes.

Les surfactines (pumilacine, surfactine, lichenysine, bamilocine et halobacilline) sont des heptapeptides cycliques. Elles sont identifiées chez *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans* et *B. licheniformis*. Elles agissent à la fois comme agents antifongiques et antibactériens. L'effet inhibiteur des surfactines n'est probablement pas dû à un antagonisme direct mais plutôt à une interférence avec le processus de colonisation de l'agent pathogène (Etesami *et al.*, 2023). Les surfactines possèdent également divers éléments importants distincts, tels que la réduction de la tension superficielle et la participation aux activités de signalisation (Sansinenea et Ortiz, 2011). En raison de leur nature amphiphile, les surfactines peuvent s'intégrer dans les couches lipidiques et perturber les membranes cellulaires d'autres organismes (Ongena et Jacques, 2008). Bien que la surfactine ne puisse pas être considérée comme une molécule antimicrobienne, elle a néanmoins la capacité d'interagir avec les membranes biologiques et d'induire des modifications structurelles (Deleu *et al.*, 2013). En contribuant à la motilité et à la formation de biofilms, les surfactines sont impliquées dans la colonisation des tissus végétaux, permettant indirectement à *Bacillus* de supplanter les phytopathogènes pour l'espace et les nutriments. Les surfactines sont également impliquées dans l'interaction moléculaire avec l'hôte et sont bien caractérisées comme déclencheurs de l'ISR chez les plantes (Andrić *et al.*, 2020). D'autres études ont montré que la suppression efficace de la fusariose du concombre est obtenue grâce à la colonisation de la souche productrice de surfactine *B. subtilis* B006 dans la rhizosphère (Tab. 2) (Jia *et al.*, 2015). *B. subtilis* 9407 est connu pour produire de la surfactine, il s'est révélé très efficace dans le contrôle biologique des plants de melon dans les serres, soulignant l'importance de la surfactine dans le biocontrôle (Gélis-Jeanvoine *et al.*, 2017).

L'activité antimicrobienne de la surfactine peut être liée à un effet synergique avec d'autres lipopeptides cycliques. La coproduction de deux composés antifongiques par les souches de *Bacillus* renforce leurs propriétés antifongiques. La surfactine et l'iturine sont les lipopeptides les plus courants chez *Bacillus*. Dans une étude, la combinaison de surfactine avec la bacillomycine D ou la mycosubtiline a permis un contrôle plus efficace de *F. oxysporum* f. sp. *iridacearum*. L'utilisation combinée de surfactine et de fengycine est efficace contre *F. oxysporum* f. sp. *iridacearum* (Mihalache *et al.*, 2018). *B. amyloliquefaciens* est un coproducteur de bacillomycine L, de fengycines, de surfactines et d'iturines. Cette espèce possède des propriétés similaires à celles de *B. subtilis* et est

capable de produire une variété de substances antimicrobiennes structurellement diverses, notamment des lipopeptides, des bactériocines, des enzymes dégradant la paroi cellulaire et des substances volatiles (Chen *et al.*, 2020). La spectrométrie de masse en tandem par chromatographie liquide (LC-MS/MS) a révélé la présence d'antibiotiques putatifs, notamment la surfactine, la mycosubtiline, la macrolactine et le bacillaène dans le surnageant acellulaire (CFS) de *Bacillus* responsables de la vacuolisation des cellules du pathogène. Une vacuolisation est également observée lorsque le FOA est cultivé avec *B. amyloliquefaciens* Ag1. Une hypertrophie mycélienne et une fuite du contenu cytoplasmique sont également détectées (Dimkić *et al.*, 2022).

D'autres lipopeptides non ribosomiques comprennent les kurstakines, les bacitracines, les polymyxines, les tyrocidines et les gramicidines.

Les Kurstakines sont des heptapeptides cycliques ou linéaires spécifiques de *B. thuringiensis* et *B. cereus*, capables de déstabiliser les membranes biologiques des bactéries et des champignons (Gélis-Jeanvoine *et al.*, 2017).

Les bacitracines sont des décapeptides cycliques produits par *B. licheniformis*, *B. sonorensis* et *B. subtilis*. Les polymyxines sont des décapeptides cycliques produits par *P. polymyxa*. Les tyrocidines et les gramicidines sont des décapeptides cycliques produits par *Brevibacillus brevis*. Ces lipopeptides ont une activité principalement antibactérienne, qui peut être à spectre étroit ou à large spectre, ciblant un large éventail de bactéries Gram-négatives et Gram-positives (Wan *et al.*, 2018).

Outre les lipopeptides, *Bacillus* spp. synthétisent d'autres antibiotiques non ribosomiques, notamment des peptides (bacilyline, rhizocytine, amicoumacine, mycobacilline, dodécylpipérazine) et des polycétides (bacilène, dihydrobacilène, difficidine, macrolactine), qui présentent des activités antifongiques et antibactériennes (Wang *et al.*, 2015).

Il existe trois principaux types de polycétides produits par les espèces de *B. subtilis* : le bacillaène, la difficidine et la macrolactine. Les polycétides sont connus pour leur activité antibactérienne et des variantes structurelles peuvent souvent être produites par la même souche. La difficidine présente une activité antimicrobienne en fonction de sa structure. Le dérivé de l'oxydifficidine est environ trois fois plus actif que la difficidine (Im *et al.*, 2020). Il a été rapporté que la macrolactine purifiée est active contre *F. oxysporum* et *R. solanacearum* (Yuan *et al.*, 2012). Le bacillaène peut protéger *Bacillus* spp. contre l'activité enzymatique dégradante provoquée par les concurrents (*Myxococcus xanthus* et *Streptomyces* sp. Mg1) (Barger *et al.*, 2012 ; Müller *et al.*, 2015).

Plusieurs peptides antimicrobiens synthétisés par les ribosomes et produits par *Bacillus* spp. sont des bactériocines efficaces comme agents antibactériens. Les bactériocines présentent un large spectre d'activité antibactérienne en provoquant la lyse cellulaire, en formant des pores dans la membrane cellulaire ou en inhibant la biosynthèse de la paroi cellulaire (Abriouel *et al.*, 2011 ; Bozhüyük *et al.*, 2019). *B. subtilis* et les espèces apparentées produisent des bactériocines, notamment des lantibiotiques, tels que la plantazolicine, la subtiline, l'éricine, la mersacidine, l'amylolysine, la subtilosine et l'amylocyclique (Abriouel *et al.*, 2011). L'activité des bactériocines est parfois rapportée contre des agents pathogènes des plantes (Lajis, 2020).

B. velezensis FZB42 produit de la plantazolicine, une molécule complexe synthétisée par les ribosomes qui présente des effets antibactériens contre les agents pathogènes bactériens et fongiques. Un groupe de 12 gènes chez *B. velezensis* FZB42 est essentiel pour la production, la modification, l'exportation et l'auto-immunité de ce composé naturel. L'amylocyclique est une autre bactériocine synthétisée par les ribosomes par *B. velezensis* FZB42, et un groupe de six gènes est responsable de sa production, de sa modification, de son exportation et de son auto-immunité (Rabbee *et al.*, 2023). Une analyse du génome entier de *B. subtilis* RS10 a identifié de nombreux groupes de gènes biosynthétiques codant pour des métabolites antibactériens et antifongiques, notamment la bacillibactine, la fengycine, la bactériocine, les polycétides (PK) de type III et la bacilysine (Iqbal *et al.*, 2021).

Contrairement aux peptides synthétisés par les ribosomes et modifiés post-traditionnellement, les molécules non synthétisées par les ribosomes semblent être beaucoup plus conservées au sein de l'espèce. Ces molécules sont synthétisées par de grands complexes enzymatiques modulaires (peptides synthétases non ribosomiques et polycétide synthases) (Bozhüyük *et al.*, 2019). En raison de l'organisation modulaire des synthétases peptidiques non ribosomales, un nombre croissant d'études sont consacrées à l'ingénierie de ces enzymes pour créer de nouveaux lipopeptides dotés de propriétés améliorées qui pourraient surmonter les mécanismes potentiels de résistance des pathogènes (Noman *et al.*, 2021).

Tab. 2 : Mécanismes de biocontrôle présentés par les espèces de *Bacillus* contre *Fusarium oxysporum*

Espèces de <i>Bacillus</i>	Mécanisme(s)	pathogène(s)	Maladie des plantes
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Q-426	Bacillomycine D, Fengycine A	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>spinaciae</i> .	Fusariose des épinards
<i>Bacillus subtilis</i> B006	Surfactine	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i>	Fusariose du concombre
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NJN-6	Benzothiazoles phénol, 2,3,6-triméthylphénol	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>	Fusariose du bananier
<i>Bacillus subtilis</i> B8, <i>Bacillus</i> sp B5	Chitinase	<i>Fusarium oxysporum</i>	Flétrissement des plantes
<i>Bacillus</i> sp B44	β -1,3-glucanase, chitinase, protéase, les métabolites volatiles et non volatiles	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	Fusariose de la tomate
<i>Bacillus subtilis</i> YB-04	Protéase, amylase, cellulase, β -1,3-glucanase, sidérophore	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i>	Fusariose du concombre
<i>Bacillus subtilis</i>	Sidérophore, chitinase, β -1,3-glucanase, protéase	<i>Fusarium oxysporum</i> Schl. f. sp. <i>Capsici</i>	Fusariose du poivre
<i>Bacillus subtilis</i> EPCO16	Sidérophore, chitinase, β -1,3-glucanase, protéase	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	Fusariose de la tomate
<i>Bacillus subtilis</i> SQR 9	Compétition	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i>	Fusariose du concombre
<i>Bacillus cereus</i> MH778713	Compétition	<i>Fusarium oxysporum</i>	Flétrissement fusarien
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Ag1	Peroxydase, acide hydrocinnamique	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i>	Fusariose du palmier dattier
<i>Bacillus subtilis</i>	Peroxydase, polyphénol oxydase, phénylalanine ammonia-lyase	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i>	Fusariose du concombre
<i>Bacillus licheniformis</i> CSR-D4	β -1,3 glucanase, peroxydase chitinase, polyphénol oxydase phénylalanine ammonia-lyase	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>	Fusariose du bananier

1-4-1-2- Production d'enzymes lytiques

Les activités antagonistes des enzymes constituent une stratégie importante dans la suppression des maladies des plantes. Ces enzymes sont impliquées dans la dégradation de la paroi cellulaire des micro-organismes phytopathogènes, constituant l'un des mécanismes de contrôle biologique les plus couramment signalés, principalement contre les agents pathogènes fongiques. La cellule fongique est constituée de glycoprotéines, de polysaccharides et d'autres composants qui varient selon l'espèce fongique. La production d'enzymes lytiques telles que les chitinases et les β -glucanases excrétées par le genre *Bacillus*, ont montré un effet inhibiteur sur les pathogènes d'origine fongique. Ces enzymes sont responsables de la dégradation des principaux polysaccharides qui composent la paroi cellulaire des champignons, par l'hydrolyse de leurs liaisons glycosidiques (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018).

Les chitinases brisent les liaisons glycosidiques de la chitine, le principal composant de la paroi cellulaire fongique. De nombreuses espèces de *Bacillus* spp, notamment *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. safensis*, *B. pumilus*, *B. velezensis*, etc., produisent des chitinases qui ont montré des effets inhibiteurs sur *F. oxysporum* (Jadhav *et al.*, 2017 ; Akeed *et al.*, 2020). Il a été rapporté que *B. velezensis* pourrait être développée comme bactérie chitinolytique pour une protection efficace des cultures contre les champignons pathogènes et pour lutter contre les ravageurs en réduisant les pesticides chimique (Tran *et al.*, 2022). Ainsi, Une réduction de 20 à 35 % du nombre de plantes malades est observée respectivement dans des essais en serre et au champ, lorsqu'ils sont inoculés avec *B. subtilis* productrice de chitinases (Etesami *et al.*, 2023).

Les β -glucanases hydrolysent le polysaccharide β -glucane en monomère de glucose. Le β -glucane est le deuxième polysaccharide majeur de la paroi cellulaire des champignons phytopathogènes (Dewi *et al.*, 2016). Les *Bacillus* spp. sont une source riche de β -1,3-glucanase. Ces enzymes sont isolés de *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. circulans* et *B. halodurans* (Planas, 2000). Il a été démontré que *B. subtilis* W3.15, producteur de β -glucanase, présente une forte inhibition de la croissance de *F. oxysporum* avec une réduction significative de la biomasse fongique (Putri *et al.*, 2021). *Bacillus* sp. BPR7 possède des activités chitinase et β -1,4-glucanase qui inhibent la croissance d'agents pathogènes fongiques, tels que *F. oxysporum*, *F. solani* et *R. solani in vitro* (Kumar *et al.*, 2012).

En plus de la chitine et du glucane, la paroi cellulaire fongique contient de la cellulose, des lipides et des protéines. Les cellulases, lipases et protéases bactériennes peuvent donc jouer un rôle important dans la lyse de la paroi cellulaire qui se produit au cours des processus d'interaction *Bacillus*-pathogènes (Guleria *et al.*, 2016). Il a été constaté que *B. cereus* produit de la cellulase, de la β -1,3-glucanase, de l'amylase, de la protéase, de la lipase et de la xylanase comme facteur de rupture des parois cellulaires de certains micro-organismes pathogènes du sol (Karthika *et al.*, 2020). Ainsi, *B. cereus* B8W8 sécrète des protéases et des amylases responsables de l'inhibition de plusieurs champignons phytopathogène (Khadiri *et al.*, 2023). Le chitosane se trouve également dans les parois cellulaires fongiques. Les *Bacillus* spp. productrices de chitosanase peuvent être utilisés comme BCA pour prévenir l'infection des plantes causée par des agents pathogènes (Seo *et al.*, 2014).

Des mélanges d'enzymes hydrolytiques ayant des modes d'action complémentaires peuvent être nécessaires pour une efficacité maximale, et des combinaisons appropriées d'enzymes peuvent améliorer l'activité antifongique. Dans l'ensemble, ces études indiquent clairement que les souches de *Bacillus*, possédant ces enzymes hydrolytiques, constituent un outil important dans la gestion efficace des maladies fongiques des plantes (Wang *et al.*, 2021).

1-4-1-3- Production de sidérophores

Bien que le fer soit le quatrième élément le plus abondant sur terre, dans les sols aérobies, le fer n'est pas facilement assimilé ni par les bactéries ni par les plantes, car l'ion ferrique ou Fe^{+3} , qui est la forme prédominante dans la nature est peu soluble, de sorte que la quantité de fer disponible pour l'assimilation par les organismes vivants est extrêmement faible. Le fer est un élément essentiel à différents processus biologiques tels que le métabolisme de l'oxygène, les synthèses d'ADN et d'ARN, le transfert d'électrons et les processus enzymatiques (Zuo *et al.*, 2011).

Les sidérophores sont des peptides non ribosomiques chélateurs de métaux de faible poids moléculaire, produits par certains micro-organismes et plantes, en particulier dans des conditions de carence en fer. Le rôle principal des sidérophores est de chélater le Fe, permettant sa solubilisation et son extraction des minéraux et des composés organiques. L'importance des sidérophores dans la lutte biologique repose sur la compétition pour le Fe afin de réduire sa disponibilité pour les agents pathogènes (Miljaković *et al.*, 2020). Parmi les espèces de *Bacillus*, *B. licheniformis*, *B. anthracis*, *B. velezensis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. halodenitrificans*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. pumilus* et *B. subtilis* sont les plus connus pour la production de sidérophores. Le sidérophore est induit par de

nombreuses espèces de *Bacillus*, et ces espèces participent activement à la réduction de différentes maladies des plantes. Par exemple, *B. subtilis* produit un sidérophore, qui est impliqué dans la réduction du flétrissement fusarien (Khan *et al.*, 2022). L'efficacité des souches de *B. licheniformis* MNNITSR2 et *B. velezensis* MNNITSR18 dans l'inhibition de la croissance des phytopathogènes *R. solani* et *F. oxysporum* est prouvée *in vitro*. Cela est dû à la production de sidérophores, d'enzymes lytiques et du cyanure d'hydrogène (HCN) (Devi *et al.*, 2023). D'autres travaux récents réalisés par Baard *et al.* (2023) ont constaté que *B. subtilis* (B1) et *B. tequilensis* (B2–B4) inhibent la croissance des espèces pathogènes de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. culmorum* et *F. verticillioides*) par la production de sidérophores et de protéase.

Selon leur structure, les sidérophores sont classés en trois groupes fonctionnels : hydroxamate, catécholates et carboxylates. Le catécholates est le principal sidérophore produit par *Bacillus* sp. comme la bacillibactine. Les bacillibactines contenant de la thréonine intégrée sont connues pour leur plus grande affinité pour le fer (Fe³⁺) et sont décrites comme les piègeurs de fer extracellulaires les plus dominants de *B. subtilis* dans des conditions limitées en fer. En plus de la bacillibactine, *Bacillus* spp. produisent d'autres sidérophores tels que le schizokinène et la pétrobactine qui sont également utilisés pour le biocontrôle des pathogènes fongiques foliaires et du sol après récolte (Khan *et al.*, 2016). Certaines des souches de *B. amyloliquefaciens* étudiées, telles que MBI600, BSL16 et EI6, produisent des sidérophores pour améliorer la disponibilité du fer dans le sol, ce qui implique que *B. amyloliquefaciens* pourrait être développé en tant qu'agent à fonctions multiples dans le biocontrôle et comme biofertilisant (Luo *et al.*, 2022). *B. velezensis* (RC116) favorise la croissance des plantes de tomate directement (par production de AIA et solubilisation des phosphates) et indirectement par la production de sidérophores et la sécrétion des enzymes lytiques (protéase, amylase, lipase) présentant une activité antagoniste envers *Ralstonia solanacearum* et *F. oxysporum* f. sp. lycopersici (Dong *et al.*, 2023). La séquestration du fer et la réduction du stress lié aux métaux lourds sont rendues possibles par les sidérophores microbiens, qui remplissent un double objectif (Singh et Pujari, 2022). L'utilisation d'endophytes producteurs de sidérophores comme agents de lutte biologique est considérée comme une solution prometteuse pour vaincre les maladies des plantes. Par exemple, *B. subtilis* CAS15 producteur de sidérophores est capable de contrôler la flétrissure fusarienne et a amélioré de la croissance du poivron (Yu *et al.*, 2011).

1-4-1-4- Résistance systémique induite

La résistance systémique induite (ISR) est un mécanisme bien connu par lequel l'antagoniste induit des réponses de défense de l'hôte végétal. Les plantes activent probablement l'expression de gènes cibles et activent des produits chimiques cibles dans différents systèmes végétaux pour se défendre contre les infections provoquées par les pathogènes (Chen *et al.*, 2020). Les PGPB produisent divers éliciteurs chimiques d'ISR tels que des lipopolysaccharides, sidérophores, lipopeptides cycliques, DAPG, acyl homosérine lactones et des composés volatils (Verma *et al.*, 2019). L'ISR déclenché par les bactéries bénéfiques (i) augmente la résistance des parois cellulaires végétales, *via* des barrières structurelles telles que l'accumulation de composés phénoliques sur les sites d'attaques du pathogène, l'épaississement des papilles de la paroi cellulaire en raison du dépôt de callose (ii) modifie les réponses métaboliques et la physiologie de l'hôte (accumulation induite de protéines liées à la pathogenèse (protéines PR) telles que les chitinases, les peroxydases) et (iii) augmente l'accumulation de peroxydase, de phénylalanine ammoniacque lyase, de polyphénol oxydase, de phytoalexines, ce qui conduit à une synthèse améliorée de produits chimiques pour la défense des plantes face à des facteurs de stress abiotiques et/ou à des agents pathogènes (Etesami *et al.*, 2023).

Les rhizobactéries participent à la médiation de l'ISR et s'appuient généralement sur les voies de signalisation de l'éthylène et du jasmonate, tandis que la résistance systémique acquise est favorisée grâce à l'acide salicylique (Choudhary et Johri, 2009 ; Niu *et al.*, 2016).

L'élicitation de l'ISR par *Bacillus* et ses métabolites est démontrée sur une variété de cultures permettant la défense contre les attaques d'agents pathogènes en serre et en champ (Cortese *et al.*, 2021). Pour atténuer les effets du stress biotique, *Bacillus* spp. réduit la peroxydation lipidique, augmente l'ascorbate peroxydase, la catalase, la peroxydase, la glutathion peroxydase, le polyphénol oxydase et d'autres enzymes antioxydantes, augmentant ainsi la production d'autres enzymes de défense telles que la phénylalanine ammoniacque lyase, la chitinase, la β -1,3-glucanase et les acides phénoliques (Radhakrishnan *et al.*, 2017). Différentes enzymes liées à la défense, par exemple la polyphénol oxydase, la superoxyde dismutase, la peroxydase et la phénylalanine ammoniacque-lyase, sont induites par *B. subtilis* (Khan *et al.*, 2022). *Bacillus* spp. a amélioré les activités favorisant la croissance des plantes et a supprimé les maladies du soja causées par *F. oxysporum* et *R. solani* par l'induction d'enzymes liées à la défense

(POX, PAL, PPO) (Jain *et al.*, 2016). Chez les plants de blé, après l'inoculation par *B. amyloliquefaciens* B-16, la production de multiples protéines PR et des métabolites secondaires tels que l'acide gallique et l'acide férulique sont induits, conférant une résistance contre *Bipolaris sorokiniana* (Singh *et al.*, 2016). De plus, le déclenchement d'ISR par *B. pumilus* peut diminuer la gravité de l'antracnose causée par le champignon *Colletotrichum orbiculare*, l'expérience est menée sur des concombres lors d'essais en plein champ. Par la suite, la souche commerciale de *B. pumilus* INR7 (Bayer Crop Science) qui a la capacité de déclencher l'ISR est utilisée dans la lutte biologique des plantes contre *C. orbiculare*, *R. solani* et *Fusarium* spp (Dobrzyński *et al.*, 2023). Des études récentes ont clairement montré le potentiel de *B. paralicheniformis* pour activer les enzymes antioxydantes de défense chez les plants de tomates infectés par *F. oxysporum* et prévenir les dommages oxydatifs grâce à des activités de piégeage des radicaux hydroxyles en supprimant l'apparition du flétrissement vasculaire (Jinal *et al.*, 2020).

1-4-1-5- Composés organiques volatiles (VOCs)

Les activités antimicrobiennes de *Bacillus* spp. sont également liés aux composés volatiles. Le groupe de composés volatiles le plus pertinent est celui des composés organiques volatiles (VOCs), notamment l'alcool, les aldéhydes, les cétones, les hydrocarbures, les acides et les terpènes. La majorité des VOCs sont des dérivés des voies métaboliques de *Bacillus* spp telles que la 2-nonanone produite par la β -oxydation des acides gras (Korpi *et al.*, 2009 ; Fincheira *et al.*, 2017). Les VOCs produits par *Bacillus* spp. qui constituent un type important de substance antimicrobienne, sont de plus en plus étudiés ces dernières années (Raza *et al.*, 2016). Il a été rapporté que certains de ces métabolites affectent la motilité et la formation de biofilms de pathogènes bactériens (Raza *et al.*, 2016) et/ou diminuent la germination et la croissance des spores fongiques (Yuan *et al.*, 2012). Les activités antimicrobiennes des VOCs ont été largement étudiées (Caulier *et al.*, 2019 ; Kai, 2020), y compris contre les pathogènes fongiques tels que *Sclerotinia sclerotiorum* (Lim *et al.*, 2017), *B. cinerea* (Jiang *et al.*, 2018), *A. solani* (Zhang *et al.*, 2020) ou *M. fructicola* (Liu *et al.*, 2018). Les VOCs synthétisés par *Bacillus* spp. présentent également une activité antimicrobienne contre *R. solanacearum* comme la 2-nonanone et la 2-undécانونe (Raza *et al.*, 2016). Des études ont montré que la souche L3 de *B. amyloliquefaciens* possède une forte activité antifongique contre *F. oxysporum* f.sp. *niveum*, responsable de la fusariose de la pastèque, due à l'émission de 2-nonanone et de 2-heptanone (Wu *et al.*, 2018).

L'utilisation des VOCs comme stratégie de gestion des maladies après récolte a donné des résultats prometteurs. Dans des études récentes, la pyrazine (2,5-diméthyle), le benzothiazole, le phénol (4-chloro-3-méthyle) et le phénol-2,4-bis (1,1-diméthyléthyle) émis par *B. velezensis* ZSY-1 ont réduit de manière significative la croissance *in vitro* de *B. cinerea* et d'*A. solani*, agents responsables respectivement de la pourriture grise et du mildiou de la tomate (Gao *et al.*, 2017).

Ces métabolites sont principalement considérés comme des molécules de signalisation cellulaire médiatrices des interactions inter et intracellulaires. Cependant, ils présentent également des propriétés antifongiques et antibactériennes. Par exemple, le volatile disulfure de diméthyle, favorise la croissance et la survie des plantes ainsi qu'une activité antimicrobienne (Iqbal *et al.*, 2023).

Les VOCs provoquent l'excrétion des exsudats racinaires et fonctionnent finalement comme un inducteur de défense des plantes contre les maladies bactériennes et fongiques transmises par le sol (Yi *et al.*, 2016). Parmi les composés organiques volatiles libérés par *B. velezensis* CT32, le benzothiazole et le 2,4-diméthyl-6-tert-butylphénol sont les plus efficaces contre *F. oxysporum* et les agents responsables du flétrissement vasculaire du fraisier (Li *et al.*, 2020). Ainsi, les souches de *B. velezensis* peuvent produire plusieurs VOCs. Ces derniers produits par *B. velezensis* NGJN-6 ont inhibé la croissance de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* responsable des maladies fongiques transmises par le sol. Le développement de *F. oxysporum* est entièrement supprimé par deux VOCs, les benzothiazoles phénol et le 2,3,6-triméthylphénol (Yuan *et al.*, 2012).

La réduction de la croissance des pathogènes par les VOCs pourrait être due non seulement à la toxicité, mais également à la modification du transcriptome du pathogène (Poulaki et Tjamos, 2023).

1-4-1-6- Compétition pour les nutriments et l'espace

Le contrôle biologique se produit lorsque des agents pathogènes et des organismes non pathogènes se disputent l'espace et les nutriments autour d'une plante hôte. Les surfaces des plantes et du sol contiennent des quantités limitées de nutriments. Par conséquent, pour coloniser efficacement les surfaces végétales, les micro-organismes pathogènes et non pathogènes doivent rivaliser pour répondre à leurs besoins nutritionnels (Shafi, et Tian, 2017). La colonisation bactérienne des racines des plantes est une étape cruciale dans l'interaction des micro-organismes avec les plantes et semble donc importante pour leurs effets de biocontrôle et d'amélioration de la croissance. Ainsi, une colonisation réussie des

racines dépend des propriétés bactériennes, notamment de la motilité et de la formation de biofilm, ainsi que des interactions de signalisation avec la plante (Blake *et al.*, 2021).

Les exsudats racinaires sont constitués d'acides aminés, de glucides et d'acides carboxyliques qui fournissent une source de nourriture et des signaux qui attirent les micro-organismes vers la rhizosphère, appelés chimiotaxie bactérienne. La chimiotaxie est nécessaire pour établir l'interaction initiale entre l'hôte et les micro-organismes, ce qui constitue une étape fondamentale pour le système racinaire (Jin *et al.*, 2019).

L'efficacité de *Bacillus* dans le biocontrôle et sa persistance dans des niches hautement compétitives de la rhizosphère découlent de son grand potentiel à synthétiser divers VOCs et métabolites secondaires bioactifs solubles. Ces derniers sont liés au processus de colonisation des racines qui protège indirectement la plante en réduisant l'espace réservé aux pathogènes et la disponibilité des nutriments, car elles sont impliquées dans le développement de la motilité des *Bacillus* et la formation du biofilm (Andrić *et al.*, 2020). Dans une étude, Cao *et al.* (2011) ont démontré le succès de la colonisation et de la survie de la souche SQR 9 de *B. subtilis* dans la rhizosphère des plants de concombre. Ils ont en outre découvert que cette souche présentait des effets inhibiteurs sur le flétrissement du concombre en empêchant la croissance du pathogène fongique *Foc* dans la rhizosphère. Par conséquent, l'inoculation des plants de tomates avec *B. cereus* MH778713 peut réduire et contrôler la flétrissure fusarienne induite par *F. oxysporum* (Ramírez *et al.*, 2022). Anckaert *et al.* (2021) ont signalé qu'une association *Bacillus* spp.-plante réussie repose sur un « dialogue » moléculaire affiné. Ceci est dû aux exsudats racinaires sécrétés par la plante, dont la composition varie selon le génotype de la plante et le stade de croissance. La proximité de la racine est d'abord détectée par la bactérie qui se déplace vers les tissus racinaires *via* la chimiotaxie. *B. velezensis* FZB42, par exemple est attiré par les exsudats racinaires du maïs qui agissent comme un chimioattractant et facilitent la motilité et la formation de biofilm. La présence d'agents pathogènes modifie les exsudats racinaires, augmentant leur attractivité pour *Bacillus* spp. Dans les plants de concombre infectés par *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, la proportion de composés chimioattractants (acide citrique et acide fumarique) est plus élevée que celle des plantes non infectées, ce qui entraîne une colonisation accrue des racines par *B. velezensis* SQR9 (Abdallah *et al.*, 2020).

La capacité de formation de biofilm permet une colonisation efficace des racines, ce qui permet aux bactéries bénéfiques associées aux plantes de coloniser les racines des plantes (Etesami *et al.*, 2023). Les biofilms offrent un fort avantage écologique pour *Bacillus* spp., pour promouvoir la migration. Ils permettent à *Bacillus* spp. de coloniser et survivre à la

surface des racines des plantes. En effet, la plante stimule la formation de biofilm à la fois par les exsudats racinaires et par la présence de polysaccharides dérivés de la paroi cellulaire végétale qui agissent comme molécules signal. La matrice extracellulaire du biofilm améliore la compétitivité des *Bacillus* spp. dans la rhizosphère et donc sa capacité de biocontrôle (Anckaert *et al.*, 2021).

Actuellement, l'efficacité des *Bacillus* dans les processus de biocontrôle est largement documentée. Le séquençage du génome complet de *Bacillus paralicheniformis* ES-1, a démontré l'existence des gènes responsables de la production des enzymes lytiques (chitinase), la production de sidérophores, acétoïne, butanediol, la chimiotaxie, la motilité ainsi que d'autres traits PGP (Iqbal *et al.*, 2023). Dans le même contexte, plusieurs gènes du génome de *B. cereus* B25 sont liés à la production d'une grande variété de métabolites liées aux mécanismes antagonistes, notamment la production des chitinases, chitosanases, glycosides hydrolases, sidérophores, antibiotiques et la formation de biofilm (Báez-Astorga *et al.*, 2022).

1-4-2- Réponses des BCA *in situ*

Pour le contrôle biologique de la fusariose, la sélection de micro-organismes ayant un effet antagoniste sur l'agent pathogène est un critère très important. Les antagonistes doivent être efficaces *in situ* avec la capacité de compétition ou d'antibiose (Carmona-Hernandez *et al.*, 2019) et être capables de coloniser rapidement les racines des plantes (Castillo *et al.*, 2013). Par conséquent, le développement d'un BCA efficace nécessite une stratégie de sélection qui doit prendre en compte plusieurs paramètres (Cherif-Silini *et al.*, 2021).

Pour optimiser la sélection de BCA spécifiques à une maladie, il est crucial de se concentrer sur le rhizomicrobiome des plantes infectées. Il est conseillé d'effectuer un échantillonnage dans des niches écologiques qui représentent avec précision la zone agricole spécifique où le BCA sera finalement utilisé. Au sein de cette zone, le pathogène et son antagoniste coexistent, ce qui en fait un lieu idéal pour l'échantillonnage. Ainsi, le BCA doit être basé sur des souches bactériennes autochtones car l'introduction de bactéries allochtones pourrait devenir inefficace. Les BCA provenant de la rhizosphère de plantes malades ont montré une capacité élevée de colonisation des racines et de biocontrôle, qui semblent être le résultat de leur adaptation à l'environnement des pathogènes omniprésents (Huang *et al.*, 2013). La théorie selon laquelle les plantes ou le sol malades sont de bonnes sources potentielles de BCA est bien étayée. Le BCA développe des stratégies de survie

spécifiques en réponse à la prolifération d'agents pathogènes, ce qui en fait des candidats compétitifs.

La plupart des dépistages d'organismes de biocontrôle reposent sur la libération de métabolites antimicrobiens diffusibles (antibiotiques, lipopeptides, etc.). La méthode conventionnelle de criblage *in vitro* des isolats est un test de la double culture contre l'agent pathogène d'intérêt (Raymaekers *et al.*, 2020) et contre d'autres agents pathogènes, pour sélectionner des BCA ayant un large spectre d'activité (Slama *et al.*, 2019). Les espèces de *Bacillus* sont des producteurs très efficaces de molécules antibiotiques et leur activité inhibitrice contre les pathogènes des plantes *via* une action antibactérienne est le mécanisme le plus connu (Dimkić, *et al.*, 2022). De nombreuses études et revues critiques ont été consacrées à l'élucidation des effets remarquables des métabolites de *Bacillus* sur les agents pathogènes des plantes (Bakker *et al.*, 2010 ; Zhao *et al.*, 2014 ; Raaijmakers *et al.*, 2010). Cependant, d'autres performances sont requises pour l'efficacité du BCA. Elles impliquent la production d'autres métabolites, volatils (VOCs, HCN, NH₃) ou non (enzymes lytiques, chitinase, protéases, cellulases, sidérophores) (Ben Mefteh *et al.*, 2018 ; Díaz-Valle *et al.*, 2019). Cet arsenal de métabolites libérés par les espèces de *Bacillus* contribue efficacement à la lutte contre les maladies en inhibant la croissance des phytopathogènes et en activant l'immunité des plantes contre divers facteurs de stress (Alenezi *et al.*, 2021). Malgré l'existence de toutes ces potentialités, la capacité de colonisation des racines et la compétition pour l'espace et les nutriments restent le point critique de la compétence du BCA. Ces propriétés peuvent être examinées *in vivo* par inoculation dans un système gnotobiotique exploitable sur des plantes modèles ou sur la plante cible dans des conditions contrôlées (Kerbab *et al.*, 2021 ; Rabhi *et al.*, 2022). Dans ce cas l'interaction du BCA et du pathogène sont les seuls paramètres à contrôler. Bien que plusieurs études aient mentionné l'efficacité du BCA suite à la production de métabolites sur milieu, peu d'études ont comparé les résultats de différentes stratégies de criblage et ont conclu que les tests sur plante entière sont la stratégie la plus efficace (Daayf *et al.*, 2003). Les méthodes de dépistage nécessitent des mécanismes de contrôle multifactoriels ou médiés par les plantes. Non seulement les sources de nutriments, mais aussi les molécules de signalisation et les chimioattractants sont à considérer, souvent très spécifiques de certaines espèces voire souches bactériennes, qui pourraient améliorer l'efficacité d'un BCA contre les pathogènes hôtes des plantes (Chen *et al.*, 2019). De plus, le BCA est testé pour ses activités PGP qui en plus favorisent la croissance des plantes et d'atténuent divers facteurs de stress environnementaux naturels. Ainsi, plusieurs propriétés

souhaitables présentes dans un seul inoculant ou une seule population de bactéries peuvent être exploitées avec succès.

En revanche, le comportement du BCA incorporé dans le sol et son interaction avec les communautés microbiennes végétales nécessitent des mesures supplémentaires. Une fois inoculé dans le sol, le BCA rencontre et interagit avec des communautés microbiennes distinctes en fonction des espèces végétales et des facteurs environnementaux. Par conséquent, la survie et la disponibilité du BCA dans le sol sont essentielles. Comprendre la structure et la fonction des communautés microbiennes pourrait permettre d'apprécier et de mettre en valeur le potentiel de ces inoculants bactériens. Les inoculants bactériens doivent être présents dans la rhizosphère végétale à une densité de biomasse suffisante et pendant une durée suffisante pour avoir un effet actif, notamment pour la protection des cultures. Cela dépend de la capacité de l'inoculant bactérien à proliférer et à coloniser efficacement le système racinaire, ce qui est largement considéré comme l'étape limitante du contrôle biologique. La lutte biologique peut être inefficace *in situ* en raison d'une mauvaise colonisation des bactéries dans la rhizosphère (De Souza *et al.*, 2019). Pour cela, les PGPB doivent posséder des propriétés spécifiques permettant de les utiliser efficacement. Elles doivent être capables de survivre dans le sol, être compatibles avec la culture sur laquelle elles sont inoculées et interagir avec la microflore indigène du sol et les facteurs abiotiques (Basu *et al.*, 2021 ; Ahmad *et al.*, 2023). La capacité productive intrinsèque d'une souche est affectée par des facteurs environnementaux. Une fois qu'une souche microbienne bénéfique est capable de coloniser une plante hôte, elle peut être capable de synthétiser une variété d'activités qui contribuent à la condition physique de la plante (Meena *et al.*, 2017).

L'inoculation de souches externes peut modifier la structure de la communauté microbienne. Il convient de noter que les PGPB inoculées influencent positivement la rhizosphère en stimulant la communauté bactérienne bénéfique (Roesti *et al.*, 2006 ; Saadaoui *et al.*, 2022). Les bioinoculants peuvent modifier l'équilibre des communautés bactériennes par la sélection des populations bénéfiques (Roesti *et al.*, 2006). Elles peuvent induire des hormones de croissance et d'autres métabolites qui favorisent la prolifération d'autres bactéries natives. Les interactions entre le microbiote et le BCA affecteront le contrôle des agents pathogènes et la pathogénèse. Ainsi, ces espèces bactériennes peuvent être utilisées pour renforcer ou activer les systèmes de défense des espèces végétales grâce à des effets additifs ou synergiques entre souches (Rojas-Solís *et al.*, 2016 ; Timm *et al.*, 2016). Le microbiote fonctionnel peut être hérité verticalement *via* la graine (Lemanceau *et*

al., 2017) ou horizontalement *via* l'environnement. La diversification bactérienne découle de leur capacité à effectuer un transfert horizontal de gènes entre différents groupes phylogénétiques (McDonald *et al.*, 2017).

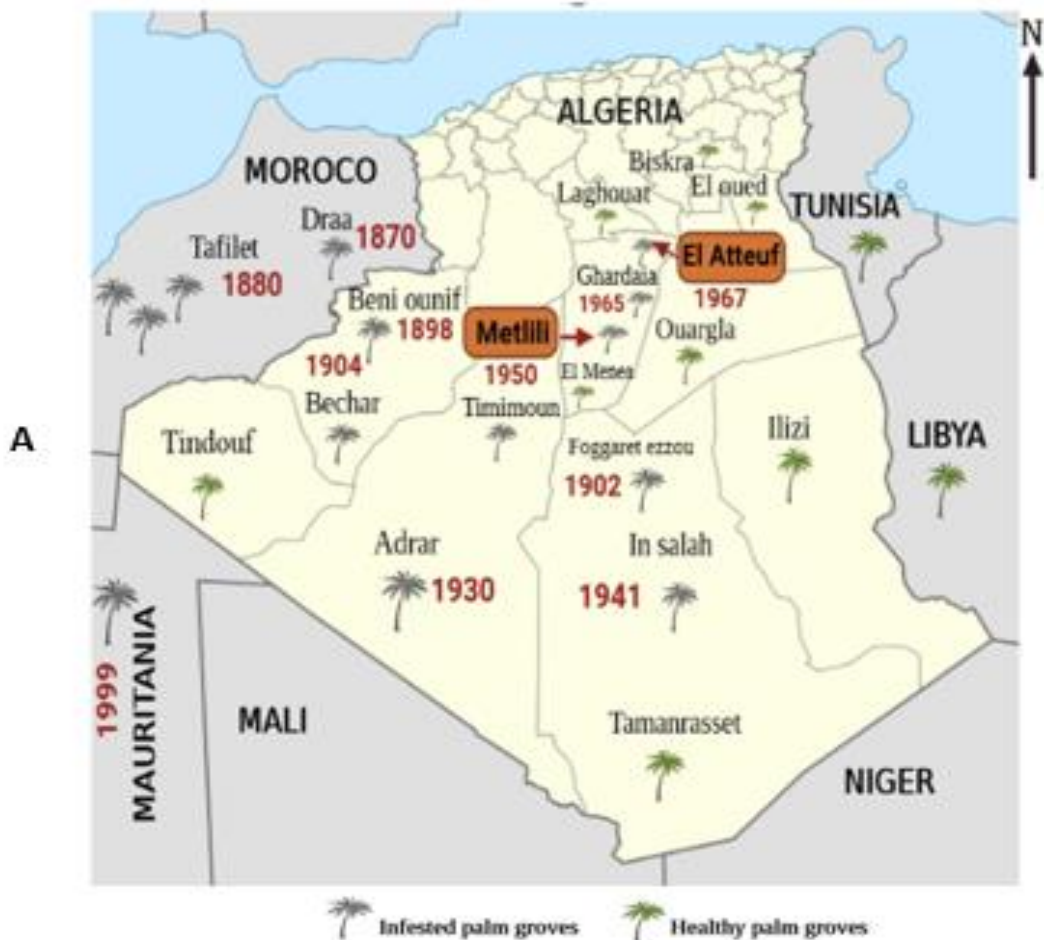
Par conséquent, manipuler le microbiote végétal en utilisant les PGPB et en exploitant leurs propriétés physiologiques est l'une des stratégies possibles pour modifier la rhizosphère et réduire l'utilisation de produits chimiques en agriculture. Ainsi, la rigueur accrue dans la sélection des antagonistes afin d'obtenir des souches ayant toutes les capacités de protection, et leur persistance dans le sol, après inoculation, sont déterminantes pour la réussite de leur établissement dans la rhizosphère (Kerbab *et al.*, 2021).

2- Matériel et méthodes

2-1-Isolement, criblage et caractérisation des souches bactériennes à caractère antagoniste

2-1-1- Description et localisation des sites de prélèvement

Le Bayoud est une maladie originaire de la vallée du Drâa au Maroc, observée pour la première fois vers 1870 (Fig.10A) (Fernandez *et al.*, 1995). Depuis lors, l'épidémie a progressé vers l'Est., et a atteint l'Ouest de l'Algérie en 1898 (Djerbi, 1988). Son extension s'est poursuivie vers le Sud-Ouest et le Sahara central de l'Algérie en 1941. Ensuite, elle s'est propagée dans les palmeraies du centre algérien (dans la wilaya de Ghardaïa) atteignant Metlili en 1950, la région du M'zab (Ghardaïa) en 1965, El Atteuf en 1967 (Bahriz et Bouras, 2020) et El Ménéa (El-Goléa) en 1978 mais la maladie a pu être éradiquée de cette oasis (OEPP, 1994).



B



Fig. 10 : Progression du Bayoud en Afrique du Nord et en Algérie (A). Symptômes de la maladie sur palmier infecté (B).

Les échantillons sont collectés à partir de palmerais infectées ou saines. Sur ces sites plusieurs palmiers présentent les symptômes évocateurs du Bayoud (Fig.10B). Les prélèvements sont effectués sur deux sites (Fig. 10A) :

El Atteuf : une commune de la wilaya de Ghardaïa en Algérie, située dans la région du Mزاب à 9 km au Sud-Est de la ville de Ghardaïa (32°28'49.0"N, 3°44'55.2"E).

Metlili : située également dans le Mزاب à 40 km au Sud de la ville de Ghardaïa (32°20'12.1"N, 3°36'35.4"E).

Les prélèvements sont composés de sol rhizosphérique de palmier sain (HRh) et infecté (IRh), de sol non rhizosphérique (SNRh) et des racines de palmiers sains (HR) et infectés (IR). Chaque échantillon est recueilli dans un récipient stérile gardé au frais et transporté au laboratoire.

2-1-2- Matériel biologique

2-1-2-1- Souches fongiques

Cinq souches de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (FOA1, FOA2, FOA3, FOA4 et FOA5) ont été aimablement fournis par l'Institut National de Protection des Végétaux-Algérie. Les champignons pathogènes ont été isolés de la région de Ghardaïa et identifiés par cet institut. D'autres champignons phytopathogènes (*Alternaria alternata* Aa, *Phytophthora infestans* Pi, *F. solani* Fs et *F. graminearum* Fg) ont été obtenus à partir de la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas de Sétif.

2-1-2-2- Matériel végétal

Des graines de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour) sont utilisées dans cette étude. Les graines sont stérilisées par une solution d'hypochlorite de sodium (20%) pendant 20 mn puis rincées plusieurs fois à l'eau stérile. Les graines sont, ensuite, trempées dans de l'eau pendant une semaine, puis mises à germer aseptiquement dans des boîtes de Pétri tapissées de papier absorbant imbibées d'eau distillée stérile pendant 15 jours à température ambiante et à l'obscurité.

2-1-3- Isolement des bactéries

L'isolement des bactéries des différents échantillons est effectué en utilisant trois milieux de culture : TSA (Trypticase Soja Agar), King B et GYM (Glucose Yeast Malt). 1g de chaque sol est additionné à 10 ml d'eau physiologique (8,5 g/l NaCl) stérile. Le mélange est agité pendant 30mn puis une série de dilution décimale est réalisé de (10^{-1} à 10^{-7}). 0.1 ml de chaque dilution est ensuite ensemencé par étalement sur la surface des différentes géloses. Pour l'isolement des endophytes 1g de racines est rincé à l'eau puis désinfecté par l'éthanol à 70% pendant 3 mn, ensuite stérilisé par l'hypochlorite de sodium à 3% pendant 15mn. Les racines sont ensuite rincées plusieurs fois, avec de l'eau distillée stérile et le dernier rinçage est mis à incuber à 30° C pendant 24h sur gélose TSA pour vérifier la désinfection. Les racines stérilisées sont broyées dans un mortier stérile puis additionnées à 10ml d'eau physiologique stérile. Des dilutions décimales sont effectuées de 10^{-1} jusqu'à 10^{-6} et 0.1ml de chaque dilution est ensuite étalé sur les différentes géloses. L'étalement est réalisé en duplicata et les boîtes sont incubées à 30° C pendant 48h. Le nombre de colonies est compté et le résultat est exprimé en Unité Formant Colonie par gramme de sol ou de racines (UFC/g) selon la formule suivante :

$$N = \Sigma C / (n_1 + 0.1n_2) dV$$

C : Le nombre de colonies comptées sur toutes les boîtes ayant un nombre compris entre 15 et 300 colonies.

n₁ : le nombre de boites retenues à la première dilution.

n₂ : le nombre de boites retenues à la deuxième dilution.

V : le volume de l'inoculum exprimé en ml.

d : le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

Les colonies caractéristiques sont repiquées pour l'obtention de cultures pures. Les souches bactériennes obtenues sont conservées pour une courte période dans des géloses en pente à

4° C et pour une longue période la conservation est faite à -20° C dans un milieu additionné de glycérol à 30 %.

2-1-4- Dépistage *in vitro* de l'activité antifongique des isolats bactériens

L'activité antifongique *in vitro*, est effectuée par le test de la double culture. Cette méthode est évaluée par la mesure du taux de croissance des hyphes de champignons en présence et en absence des cultures bactériennes. Un total de 335 souches bactériennes isolées (HRh=126, IRh=91, SNRh=62, HR=33 et IR=23) sont testées pour leur pouvoir antifongique envers la souche FOA1. L'activité antifongique est réalisée sur gélose PDA (Potato Dextrose Agar). Un disque de 5mm de diamètre d'une culture fongique jeune est déposé au centre de la gélose PDA. 2µl de chaque culture bactérienne fraîche sont ensemencés en spot à 3 cm de la souche fongique. Des boîtes de PDA contenant uniquement la culture fongique constituent le témoin négatif. Le test est réalisé en triplicata. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 7 jours. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$PI\% \text{ (pourcentage d'inhibition)} = 1 - (a/b) \times 100 \%$$

a : est la distance de croissance du champignon dans une boîte de Pétri inoculée avec l'isolat bactérien et

b : est la distance de croissance du champignon dans une boîte de Pétri témoin sans bactérie.

2-1-5- Potentialités antifongiques des souches sélectionnées

Huit souches bactériennes sélectionnées 83, 84 (HRh), 300 (IRh), 333, 322 (SNRh), 260, 249 (IR), 227(HR) présentant de meilleur taux d'inhibition envers le FOA *in vitro*, sont testées pour leur capacité à inhiber la croissance de différentes souches de FOA (FOA1, FOA2, FOA3, FOA4, FOA5) et d'autres champignons phytopathogènes (Aa, Pi, Fs et Fg) par la méthode de la double culture. Chaque culture bactérienne (10^8 cellules/ml) est inoculée sur le milieu PDA par une strie horizontale à l'extrémité de la boîte de Pétri. Un disque de gélose de chaque culture fongique fraîche a été placé à l'autre extrémité de la boîte de Pétri. Le test est réalisé en triplicata. Les boîtes sont incubées pendant 7 jours à 28 °C. Les boîtes non inoculées avec les bactéries antagonistes sont considérées comme contrôle négatif. Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule précédente.

2-1-6- Caractérisation moléculaire des souches bactériennes sélectionnées

2-1-6-1- Extraction de l'ADN bactérienne et amplification de l'ARNr 16S

L'extraction de l'ADN des huit bactéries sélectionnées (83, 84, 227, 249, 260, 300, 322 et 333) est réalisée à l'aide d'un kit d'isolement de l'ADN microbien UltraClean® (QIAGEN, Bâle, Suisse) conformément aux recommandations du fabricant. La quantité et la qualité de l'ADN génomique ont été évaluées par un spectrophotomètre UV NanoDrop NT-100 (Witec AG, Suisse) et par observation visuelle par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%. L'identification moléculaire des isolats a été réalisée par amplification de la région de l'ARNr 16S à l'aide des amorces fD1 (5' 'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') et rP2 (5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3'). Les amplifications PCR sont effectuées dans un volume total de 25 µl avec 2,5 µl 10 Ex Taq tampon (20 mM Tris–HCl, pH 8,0, 100 mM KCl), 2 µl mélange dNTP de 2,5 mM, 0,5 µM de fD1 et rP2, 1 unité d'ADN Taq polymérase (Promega, Dübendorf, Suisse) et 5 ng d'ADN génomique à l'aide d'un thermocycleur Biometra T One (Labgene, Chatel-Saint-Denis, Suisse). Les conditions de cycle suivantes sont utilisées : étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 1 mn suivie de 35 cycles (dénaturation à 94°C pendant 30 s, hybridation à 55°C pendant 30 s et élongation à 72°C pendant 20 s et étape d'élongation finale à 72°C pendant 5 mn). Un kit de purification PCR de MinElute (Qiagen, Bâle, Suisse) est ensuite utilisé pour purifier les amplicons PCR résultants selon les spécifications du fabricant (Meftah *et al.*, 2019 ; Luchi *et al.*, 2013).

2-1-6-2- Séquençage de l'ADN et analyse phylogénétique

Le séquençage des amplicons PCR d'ADNr 16S purifiés est effectué dans les deux directions à l'aide d'un kit de séquençage de cycle BigDye™ Terminator v3.1 et d'amorces fD1 et rP2, comme décrit dans Slama *et al.* (2019). Les réactions de séquençage sont résolues en utilisant les installations ABI 3130 XL disponibles à l'iGE3 [Institut de génétique et de génomique de Genève, Centre médical de l'Université de Genève (CMU), Suisse]. Les séquences partielles sont générées par l'édition manuelle de fichiers de séquences brutes à l'aide de SeqMan™II (DNASTAR, Madison, WI, États-Unis). La séquence partielle est ensuite comparée à la base de données GenBank de NCBI (National Center of Biotechnology Information- USA (NCBI) pour identifier les espèces apparentées les plus proches. La position phylogénétique exacte des différents isolats est également déterminée par une analyse phylogénétique des séquences des isolats avec leurs parents les plus proches extraits de GenBank. Les séquences collectées sont alignées à l'aide du

programme Web d'alignement de séquences multiples MAFFT (Katoh et Toh, 2008) et utilisées pour générer des arbres phylogénétiques à partir de l'algorithme de la probabilité maximale (ML) (Felsenstein, 1981). MEGA v.6 (Tamura *et al.*, 2013) avec des distances évolutives calculées à l'aide du paramètre Kimura 2 (Kimura, 1980). La validité des branches dans les arbres résultants est évaluée par un rééchantillonnage bootstrap des ensembles de données avec 1000 répétitions.

2-1-7- Effet de la coculture bactérienne sur la croissance du FOA

Afin de trouver une éventuelle synergie entre les différents isolats pour améliorer la performance de leur activité antifongique envers le FOA, les souches bactériennes sont testées en coculture. Pour cela des cultures bactériennes sur milieu TSB contenant soit une seule bactérie soit la combinaison de deux bactéries sont incubées 24h à 30° C. Après incubation, les cultures bactériennes (10^8 cellules/mL) ont servi à ensemercer les boîtes de Pétri PDA par la méthode de la culture en double comme décrit précédemment par une strie horizontale sur la gélose PDA à l'extrémité de la boîte. Un disque de 5mm de diamètre d'une culture fongique jeune est déposé à l'autre extrémité de la gélose. Le test est réalisé en triplicata. Les boîtes sont incubées 7 jours à 28° C. Les boîtes ensemençées par le champignon en absence de bactéries sont considérées comme témoins négatif. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la relation décrite ci-dessus.

2-1-8- Effet des surnageants bactériens sur la croissance du FOA

Pour tester l'activité antifongique des filtrats de cultures bactériennes, les isolats bactériens sont inoculés individuellement ou par paires dans le cas de coculture dans des flacons contenant 20 ml de bouillon TSB. Les flacons sont incubés à 30° C pendant 48h sous agitation. Les suspensions bactériennes sont ensuite centrifugées à 3000 rpm pendant 15 mn. Les surnageants bactériens sont incorporés aseptiquement au milieu PDA en surfusion (à une concentration de 25%) additionné d'oxytétracycline à 100 µg/ml et couler dans des boîtes de Pétri (Dutta *et al.*, 2019). Un disque d'une culture fongique jeune est déposé au centre de la gélose PDA. Les boîtes ensemençées avec le champignon en absence de surnageant bactérien sont considérées comme des témoins négatifs. Le pourcentage d'inhibition est calculé après 7 jours d'incubation à 28° C selon la formule précédente.

2-1-9- Activité antifongique des composés organiques volatiles (VOCs)

L'effet antagoniste des VOCs produits par les souches bactériennes est testé sur la croissance mycélienne du FOA. Des boîtes de Pétri compartimentées (deux compartiments) sont utilisées. Des cultures bactériennes (10^8 cellules/mL) sont ensemencées par stries sur le milieu TSA contenu dans un compartiment de la boîte de Pétri. Un disque de gélose fongique issu d'une culture jeune de FOA est ensemencé sur le milieu PDA contenu dans l'autre compartiment (He et *al.*, 2020). Un contrôle négatif est réalisé en inoculant uniquement le champignon. Les boîtes sont ensuite, scellées et incubées à 28 °C pendant 7 jours. Le pourcentage d'inhibition est calculé en utilisant la formule précédente.

2-1-10- Test de biocontrôle, *in vivo*, sur les racines du palmier dattier

Les bactéries sélectionnées sont testées pour leur capacité à inhiber la croissance du champignon, *in vivo*. Les bactéries sont cultivées dans des flacons contenant 50 ml de bouillon LB (Luria-Bertani) ensemencés par 1 ml d'une culture bactérienne fraîche et incubées à 30° C pendant 48 h sous agitation. Après incubation, les cultures sont centrifugées à 5000 tr/mn pendant 15 mn et les culots bactériens sont suspendus dans de l'eau distillée stérile et ajustés à une concentration de 10^8 cellules/ml. 10 graines du palmier dattier, germées comme décrit précédemment, sont trempées dans chaque suspension bactérienne pendant une heure puis infectées par des disques (5mm de diamètre) d'une culture fongique de FOA âgée de 7 jours. Les noyaux sont déposés dans des boîtes de Pétri tapissées de papier absorbant imbibées d'eau stérile, scellées et incubées à température ambiante à l'obscurité pendant 45 jours. Le test est réalisé en duplicata. Les graines infectées uniquement par le FOA en absence de bactéries sont considérés comme des témoins positifs. Par contre celles qui ne sont ni infectées ni traitées sont considérés comme des témoins négatifs. Le degré de protection est évalué en calculant le pourcentage d'infection (nombre de graines infectées sur nombre total des graines) et en mesurant la nécrose des racines malades.

2-1-11- Mesure des potentialités améliorant la croissance des plantes (PGP) des bactéries sélectionnées

Un screening des activités PGP des souches sélectionnées est effectué dans le but de déterminer leurs performances. Ces tests sont effectués en triplicata.

2-1-11-1- Production de l'acide indole acétique

La production d'acide indole-3-acétique (AIA) est évaluée en cultivant les isolats bactériens dans le bouillon Luria-Bertani (LB) additionné de 2 g/L de tryptophane comme précurseur de l'AIA et incubé pendant 4 jours à 30° C. La culture bactérienne est centrifugée à 3000 rpm/mn pendant 30 mn. Un volume de 2 ml de surnageant est mélangée avec 100 µl d'acide orthophosphorique et 4 ml de réactif de Salkowski (50 ml, 35 % d'acide perchlorique, solution de FeCl₃ de 1 ml 0,5 M) et incubé à l'obscurité pendant 1 h. Le développement de la couleur rose indique la production d'AIA et l'absorbance est lue à 530 nm (Patten et Glick, 2002). Les concentrations de l'AIA sont déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage.

2-1-11-2- Solubilisation des phosphates

La solubilisation des phosphates est déterminée par la culture des isolats sur le milieu Pikovskaya, (Pikovskaya, 1948) contenant du Ca₃(PO₄)₂ comme source de phosphate. Les cultures sont incubées à 30 °C pendant 7 jours. Le phosphate soluble est dosé dans le surnageant selon la méthode colorimétrique de Olsen and Sommers (1982). La concentration du phosphate est déterminée par la mesure de la densité optique à 610 nm. Une courbe d'étalonnage standard est effectuée avec une solution de KH₂PO₄.

2-1-11-3- Production de sidérophores

La production de sidérophores est déterminée sur milieu au Chrome azurol S (CAS). La production de sidérophores est évaluée en inoculant un milieu exempt de fer ; le milieu King B incubé à 30 °C pendant 48 h. L'absorbance des surnageants de culture additionnés de solution de CAS (Schwyn et Neilands, 1987) est mesurée à 630 nm.

Le pourcentage des sidérophores est calculé selon la formule suivante (Gokarn, 2010) :

$$\text{St-Se/St} \times 100$$

St : DO de la solution témoin (CAS).

Se :DO de la solution de l'échantillon.

2-1-11-4- Production d'HCN

La production de l'acide cyanhydrique est effectuée selon la méthode de Lorck (1948) sur milieu HCN solideensemencé par strie à partir des cultures bactériennes. Un disque de papier imprégné d'une solution de picrate de sodium (5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium) est déposé au fond du couvercle de la boîte de Pétri. Les boîtes sont

scellées et incubées à 30°C pendant 2 jours. Le changement de couleur du papier du jaune à l'orange indique la production d'HCN.

2-1-11-5- Production de NH₃

La production de NH₃ est testée sur eau peptonée inoculée par les cultures bactériennes (Cappuccino et Sherman, 1992) et incubée à 30°C pendant 48h. L'addition de 0.5 ml du réactif de Nessler donnant une couleur jaune à marron indique la production de NH₃.

2-1-11-6- Fixation d'azote

La capacité de fixer l'azote atmosphérique est détectée par la croissance des bactéries sur milieu exempté d'azote après incubation à 30°C pendant 3 jours.

2-1-12- Production d'enzymes hydrolytiques

La capacité des isolats à produire des enzymes hydrolytiques est testée sur milieu gélosé additionné des substrats correspondants permettant la libération des enzymes. La production de cellulase, de chitinase, d'amylase, de xylanase et de pectinase est effectuée sur milieu gélosé contenant respectivement du carboxyméthylcellulose (1% W/V) de la chitine (1% w/v) de l'amidon (0.5% w/v) du xylane (1% w/v) et de la pectine (1% w/v). Les milieux sont ensemencés par spot à partir des cultures bactériennes. Les boîtes sont incubées 3 jours à 30°C. La dégradation des substrats se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des colonies après révélation par addition d'une solution de lugol. L'activité lipasique est testée sur milieu gélosé additionné de tween 20 (oléate de sorbitol) (Kumar *et al.*, 2012) ensemencé par spots et incubés à 30°C pendant 3 jours. La dégradation du tween se traduit par l'apparition d'un halo opaque autour de la colonie dû à la précipitation d'oléate de calcium. La production de protéase est conduite sur milieu gélosé au lait écrémé (Loper et Schroth, 1986). Les boîtes sont ensemencées par spot et incubées à 30 ° C pendant 3 jours. La production de protéase est enregistrée par le développement d'une zone claire (halo) autour des colonies, indiquant une hydrolyse des protéines par les bactéries. Les résultats des différentes activités enzymatiques sont exprimés par la mesure du diamètre des halos de production des enzymes.

2-1-13- Effets des stress abiotiques (sel, pH, PEG et température) sur la croissance des souches bactériennes

La capacité des souches bactériennes à tolérer le stress salin, le stress hydrique et différentes valeurs de pH est réalisé sur gélose TSA en présence de concentrations

croissantes de NaCl (0, 200, 400, 600, 800, 1000 et 1200 mM), de PEG (polyéthylène glycol 8000) (10, 20, 30 et 40%) et à différentes valeurs de pH (4, 7, 9 et 10), respectivement. 2 µl de chaque culture bactérienne sont ensemencés par spot sur les différents milieux et incubées à 30°C pendant 48 h. La capacité des souches à croître sous différentes températures est réalisée sur gélose TSA ensemencée de la même façon et incubée à 4, 10, 20, 30, 37, 45 et 50 °C pendant 48 h. Toute croissance bactérienne sur la gélose indique la capacité des souches à tolérer les différents stress abiotiques (Cherif-Silini *et al.*, 2019).

2-1-14- Détermination de la résistance aux métaux lourds

La résistance des souches bactériennes au plomb, au cadmium, au cobalt et au mercure est évaluée sur milieu solide LB additionnés des différents sels métalliques PbCl₂, Cd (NO₃)₂, CoCl₂, HgCl₂, à des concentrations de 100, 250, 500 et 1000 ppm. 10 µl de chaque suspension bactérienne de 24h sont déposés sous forme de spot à la surface de la gélose. Toute croissance bactérienne sur le milieu après une incubation à 30°C pendant 72 h, indique la capacité des isolats à résister aux métaux lourds (Yu *et al.*, 2014).

2-2 – Effets du biocontrôle des *Bacillus*, *in vivo*, contre la Fusariose du palmier dattier

L'objectif de cet essai est d'analyser l'efficacité des *Bacillus* utilisés en tant qu'agents de contrôle biologique, à travers une série de traitements visant à prévenir, contrôler ou guérir l'infection causée par le FOA chez les plants de palmier dattier.

2-2-1- Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans les tests d'inoculation comme des agents de biocontrôle sont 84, 260, et 333 identifiées en tant que *Bacillus halotolerans*, *Bacillus paralicheniformis*, et *Bacillus* sp., respectivement. Ces isolats sont sélectionnés sur la base de l'inhibition de l'infection par le FOA sur les graines germées du palmier. Ces isolats possèdent, également, d'autres attributs favorisant la croissance des plantes.

2-2-2- Préparation de l'inoculum bactérien et fongique

La préparation de l'inoculum bactérien consiste à cultiver chaque souche bactérienne dans un bouillon TSB incubé sous agitation à 30° C pendant 48h. Après centrifugation, les culots bactériens sont récupérés et suspendus dans de l'eau distillée stérile. La concentration bactérienne est déterminée en mesurant la densité optique à 630 nm, en

sachant qu'une densité optique de 1 correspond environ à une concentration de 10^8 cellules/ml. Un dénombrement bactérien UFC/ml est effectué. Les suspensions bactériennes obtenues sont utilisées pour l'inoculation ultérieure des plantes.

L'inoculum fongique est préparé par inoculation du bouillon SNB (synthetic nutrient broth) par des disques (5mm de diamètre) d'une culture fongique de FOA âgée de 7 jours. Le milieu est incubé à une température de 28° C pendant 7 jours sous agitation. Après croissance, la culture est filtrée à travers du papier filtre afin d'éliminer les débris mycéliens. Le filtrat, ainsi, obtenu est ensuite centrifugé 15 mn à 3000 rpm et le surnageant est éliminé. Les spores sont reprises dans un volume d'eau distillée stérile. La concentration sporale est ajustée à 10^5 spores/ ml à l'aide d'une cellule de Malassez. La suspension sporale servira à l'inoculation ultérieure des plantes.

2-2-3- Essai sur support stérile

Les semis sont effectués dans des pots en plastique préalablement désinfectés avec de l'hypochlorite de sodium et rincés plusieurs fois. Ils sont, ensuite, remplis d'environ 750 g de sable lavé à l'eau et stérilisé au four pasteur à 180° C pendant 30 mn pendant trois jours consécutifs. 70 ml d'une solution d'Hoagland au $\frac{1}{2}$ sont additionnés dans chaque pot. Les graines germées sont semées à raison d'une graine par pot.

Après trois mois de croissance, les plantes au stade de 2 feuilles subissent les différents traitements : préventif, concomitant et curatif.

Dans le traitement préventif les plantules sont inoculées avec 1ml de chaque suspension bactérienne (10^8 UFC/ml) placée à proximité de la tige. Trois mois après l'inoculation, les plantes sont infectées par le FOA. 2 ml d'une suspension sporale (10^5 spore/ml) sont ajoutés à la surface du sable. Dans le traitement de concurrence les inoculum bactérien et fongique sont ajoutés simultanément à un jour d'intervalle selon les mêmes concentrations que précédemment. Dans le traitement curatif, l'infection débute au stade germination des noyaux par le dépôt des disques d'agar d'une culture de FOA âgée de 7 jours sur les racines. Les graines sont mises à incuber dans des boîtes scellées à température ambiante, à l'obscurité, pendant 15 jours. Les plantules infectées sont, par la suite, transférées dans les pots à raison d'une graine par pot. Après 22 jours, les plantules sont inoculées avec 1ml de chaque suspension bactérienne (10^8 UFC/ml). Un autre lot de plantes reçoit uniquement les bactéries. 1ml de chaque suspension bactérienne est inoculé comme précédemment. Les plantes infectées uniquement par le FOA sont considérées comme des témoins positif. Par

contre, celles qui ne sont ni infectées ni traitées sont considérés comme des témoins négatifs (-). Ainsi les pots sont divisés en six groupes avec six pots par traitement.

Groupe 1 : Contrôle négatif : C (-)

Groupe 2 : Contrôle positif : C (+) F

Groupe 3 : Bactérisé : B (84, 260, 333)

Groupe 4 : Traitement préventif : B+F

Groupe 5 : traitement concomitant : FxB

Groupe 6 : traitement curatif : F+B

Les plantes sont mises dans une chambre de culture avec des températures moyennes jour/nuit de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ et $16 \pm 2^{\circ}\text{C}$, respectivement, et une photopériode de 16 h d'éclairage. L'humidité du sable est maintenue par arrosage avec de l'eau stérile deux fois par semaine. Après une durée de 12 mois, les paramètres morphologiques et biochimiques des plantes sont déterminés.

2-2-4- Essai sur sol non stérile

Des graines de palmier dattier préalablement germées sont plantées dans des pots en plastique contenant chacun environ 4 kg du mélange sol : sable : terreau (2 :1 :1) à raison de deux à trois graines par pot. Après trois ans de croissance (2017-2020) et au stade d'expérimentation 4 à 5 feuilles, les plantes ont subi les trois types de traitements : préventif, concomitant et curatif.

Durant le traitement de concurrence, les plantes sont infectées par inoculation d'un volume de 20 ml de la suspension fongique dans chaque pot. Les plantes sont, ensuite, inoculées avec les suspensions bactériennes à raison de 5 ml par plante. Le même volume d'eau distillée stérile est utilisé pour irriguer les plantes témoins non inoculées et non infectées.

Dans le traitement préventif les plantes sont inoculées avec les suspensions bactériennes (5 ml par plante) après 8 mois de croissance les plantes sont infectées par la solution sporale du FOA à raison de 20 ml de suspension fongique par pot. Par contre, dans le traitement curatif les plantes infectées par le FOA sont inoculées avec les suspensions bactériennes 8 mois après l'infection. Les plantes sont infectées avec le FOA à raison de 20 ml de suspension fongique par pot. Les plantes non infectées sont inoculées uniquement par les suspensions bactériennes. Les plantes témoins non inoculées et non infectées reçoivent le même volume d'eau distillée stérile. Les pots sont divisés en 6 groupes avec 5 plantes par traitement.

L'expérience est réalisée dans une chambre de croissance avec des températures moyennes jour/nuit de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ et $16 \pm 2^\circ\text{C}$, respectivement, et une photopériode de 16 h d'éclairage. L'humidité du sol est ajustée et maintenue constante pendant l'expérience en arrosant avec de l'eau. Les paramètres morpho-biochimiques des plantes sont déterminées après 18 mois de traitement.

2-2-5- Analyse des paramètres morpho- biochimiques des plantes

2-2-5-1-Paramètres morphologiques

Les plantes du palmier dattier sont recueillies et lavées soigneusement à l'eau. Les racines et les feuilles sont séparées et leurs tailles sont déterminées. Leurs poids frais et secs (après 72 h à 65°C) sont également enregistrés.

2-2-5-2- Paramètres biochimiques

- Dosage de la chlorophylle

Les pigments de la chlorophylle (chlorophylle a, b, total (a+b) et caroténoïdes) sont déterminées selon la méthode décrite par Rezik *et al.* (2017). 0,25g de feuilles de chaque échantillon sont découpées en petits segments et homogénéisés dans 5ml d'acétone à 80%. Les échantillons sont conservés à -20°C pendant une nuit. L'extrait est ensuite centrifugé à 12000rpm/10mn et l'absorbance du surnageant est lue à 663, 647 et 470 nm pour déterminer les chlorophylles a, b et les caroténoïdes respectivement.

$$\text{Ch a} = 12.7 A_{663} - 2.69 A_{647} \times (V/1000 \times W)$$

$$\text{Ch b} = 22.9A_{647} - 4.68A_{663} \times (V/1000 \times W)$$

$$\text{Ch t} = \text{Ch a} + \text{Ch b}$$

$$\text{Carotenoid} = (1000 A_{470} - 1.9 \text{Chl a} - 63.14 \text{Chl b})/214 \times (V/1000 \times W)$$

- Dosage du malondialdéhyde (MDA)

La peroxydation lipidique est mesurée en quantifiant la production de malondialdéhyde (MDA) par la réaction à l'acide thiobarbiturique (TBA). 0,2 g d'échantillon sont broyées et homogénéisé dans 1 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 0,1% v/v). L'homogénat est ensuite centrifugé à 12 000 rpm pendant 10 mn. 500µl du surnageant sont mélangés avec 2 ml de TCA à 20% contenant 0,5% de TBA. Le mélange est chauffé pendant 30 minutes à 95°C puis refroidi rapidement dans un bain de glace. L'extrait est ensuite centrifugé à 12 000 rpm pendant 10 min. L'absorbance du surnageant est lue à 532 nm et la concentration du MDA est calculée en utilisant le coefficient d'extinction de 155 mmol/L^{-1}

cm⁻¹. La concentration du MDA a été exprimée en $\mu\text{mol g}^{-1}$ de PF (poids frais) (Madhava Rao et Sresty, 2000).

- **Estimation du contenu en proline**

L'extraction de la proline des feuilles et des racines est déterminée selon la méthode décrite par Carillo et Gibon (2011). 50 mg d'échantillon sont broyées et homogénéisées dans 1 ml d'éthanol : eau (40 : 60 v/v) et conservés à 4° C pendant la nuit. L'homogénat est ensuite centrifugé à 14 000 rpm pendant 5 mn. 500 μL de l'extrait sont ajoutés à 2 ml du mélange réactionnel (1 % de ninhydrine (p/v) dans de l'acide acétique à 60 %) puis chauffés à 95° C pendant 20 mn. L'extrait est, par la suite, centrifugé à 10 000 rpm/1mn. L'absorbance est enregistrée à 520 nm et la concentration de la proline est mesurée par comparaison à une courbe standard (Cherif-Silini *et al.*, 2019).

- **Estimation des sucres totaux**

Le matériel végétal (0,1 g) a été extrait dans 3 mL d'éthanol à 80 % incubé à température ambiante pendant 48 h, suivi d'une ébullition à 80 ° C jusqu'à évaporation. L'extrait a été dilué par addition de 20 ml d'eau distillée. Après centrifugation, les sucres totaux solubles du surnageant (2 ml) sont déterminés par la méthode phénol-acide sulfurique. Le mélange réactionnel est composé de 500 μl de l'échantillon et 500 μl d'une solution de phénol à 5% auxquels sont ajoutés 2,5 ml d'acide sulfurique à 95%. La densité optique est mesurée à 490 nm. Les valeurs obtenues sont traduites en concentrations de glucose par référence à une courbe d'étalonnage (Dubois *et al.*, 1956).

- **Dosage des protéines solubles**

Des échantillons de racines et de feuilles congelés (0,25 g) sont broyés en poudre fine dans un mortier sous l'azote liquide puis homogénéisé avec 5 ml de tampon phosphate de potassium (100 mM, pH 7,5) contenant 1 mM d'EDTA et 0,01% de Triton X-100. L'homogénat est ensuite centrifugé à 15 000 rpm pendant 15 mn à 4° C pour donner un extrait enzymatique brut. La teneur en protéines solubles (mg / g) est estimée par la méthode de Lowry. L'albumine du sérum bovin est utilisée comme étalon protéique (Kerbab *et al.*, 2021).

2-2-6- Détermination de l'activité des enzymes antioxydantes

- **La gaïacol peroxydase (GPX)**

La réaction de la GPX est réalisée en ajoutant 0,1 ml de l'extrait à 3 ml de mélange réactionnel contenant un tampon phosphate (100 mM, pH 6,5), du gaïacol 15 mM et 0,05%

de H₂O₂. L'évolution cinétique de l'absorbance à 470 nm est mesurée pendant 1 mn. L'activité de la GPX est calculée en utilisant le coefficient d'extinction (26,6 mM⁻¹ cm⁻¹ à 470 nm). L'activité enzymatique (U/mn/mg de protéine) est calculée comme une augmentation de l'absorbance (Kerbab *et al.*, 2021).

- **L'ascorbate peroxydase (APX)**

L'ascorbate peroxydase (APX) est estimée en observant la diminution de l'absorbance due à l'acide ascorbique à 290 nm. Le mélange réactionnel (3 ml) est constitué d'un tampon phosphate de potassium (50 mM, pH 7,0), de l'acide ascorbique 0,25 mM, du H₂O₂ 5 mM et un extrait enzymatique de 0,1 ml. La réaction démarre en ajoutant du H₂O₂ et l'oxydation de l'ascorbate est déterminée par une diminution de l'absorbance à 290 nm (E = 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹). Une unité d'APX (moles/min/mg de protéines) est définie comme la quantité d'enzyme qui oxyde 1 µmol/1 mn d'ascorbate (Kerbab *et al.*, 2021).

- **La superoxyde dismutase (SOD)**

La réaction est réalisée dans un volume final de 3 ml. Le mélange réactionnel contenant 13 mM de méthionine, 75 M de chlorure de nitro-bleu tétrazolium (NBT), 0,1 mM d'EDTA, 50 mM de tampon phosphate (pH 7,5), 50 mM de carbonate de sodium, 2 mM de riboflavine, et 0,1 ml d'extrait enzymatique est placé sous une lumière fluorescente pendant 15 min. Un mélange réactionnel complet sans enzyme, qui donne le maximum de couleur, sert de témoin. La photo-réduction du NBT par le superoxyde est stoppée en plaçant les tubes à l'obscurité. L'absorbance est enregistrée à 560 nm. L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) exprimée en U/mg de protéines est calculée par la proportion entre l'absorbance observée en présence ou en l'absence de cette enzyme (Kerbab *et al.*, 2021).

- **La catalase**

Pour l'analyse de la catalase, 0,1 ml d'extrait est ajouté à un mélange réactionnel de 2 ml contenant un tampon phosphate de potassium (50 mM , pH 7) et 20 mM H₂O₂. La diminution de l'absorbance est enregistrée à 240 nm (coefficient d'extinction de 0,036 mM⁻¹ cm⁻¹). L'activité enzymatique de la catalase est exprimée en U/mn/mg de Protéine (Aebi, 1984).

2-2-7- Analyses statistiques

Les expériences ont été réalisées en triple, les résultats étant exprimés en moyenne ± écarts types. L'ensemble des résultats ont été analysés à l'aide d'un programme statistique,

Graphpad Prism 9 en utilisant l'analyse de la variance (ANOVA) unidirectionnelle et bidirectionnelle pour déterminer l'effet significatif dans les différentes conditions de croissance par rapport à l'échantillon témoin. Lorsque des effets significatifs sont détectés, les groupes sont comparés à l'aide du test HSD de Tukey. Le niveau de signification utilisé pour tous les tests statistiques est de 5 % ($p < 0,05$). Différentes lettres sont incluses en haut de chaque colonne pour indiquer les différences entre les différents groupes.

3- Résultats

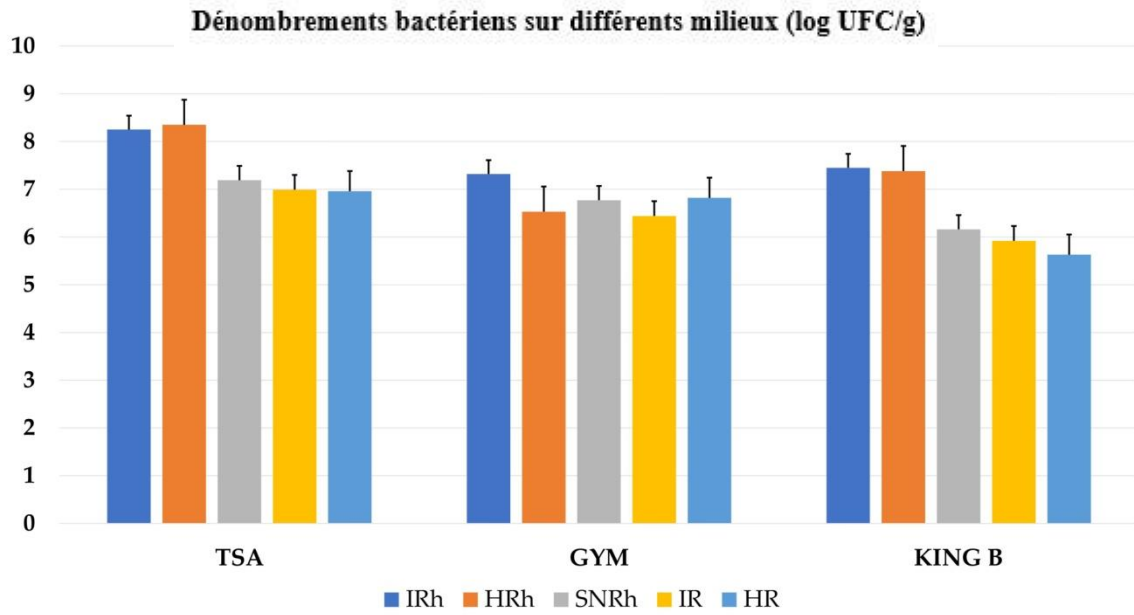
3-1- Recherche de bactéries antagonistes du FOA *in vitro*

3-1-1- Dénombrement, isolement et sélection des bactéries antagonistes

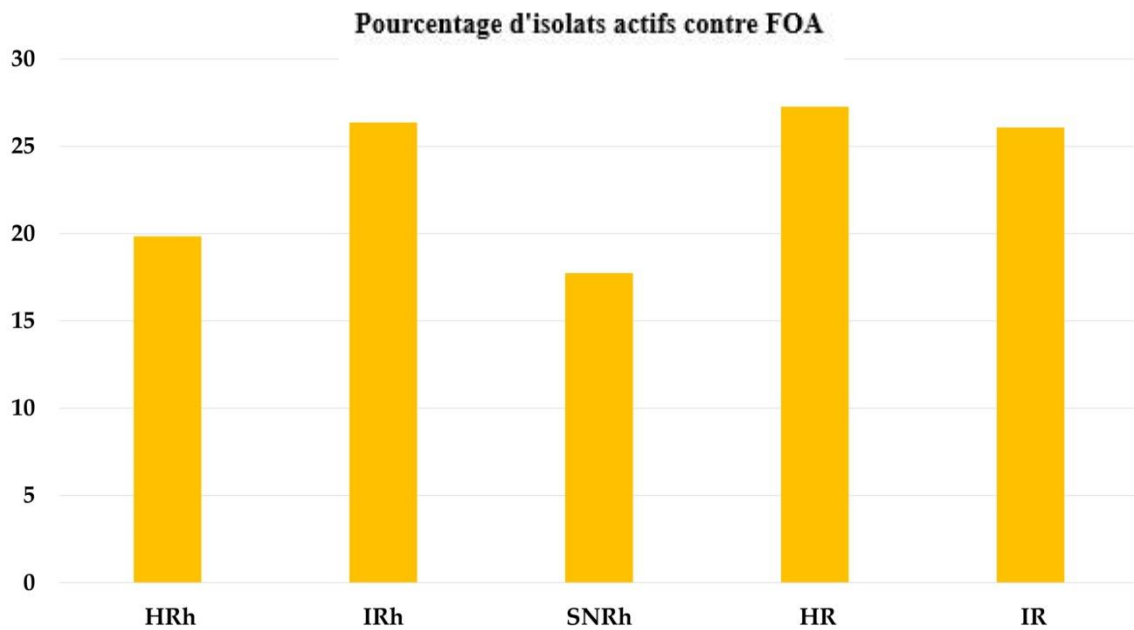
Un total de 335 souches bactériennes présentant différentes colonies caractéristiques sont isolées. 126 souches sont isolées à partir du sol rhizosphérique sain et 91 souches proviennent de la rhizosphère du sol infecté, 62 bactéries sont isolées du sol entre palmier (non rhizosphérique). Par contre, 33 bactéries endophytes sont isolées des racines saines du palmier et 23 sont isolées des racines infectées.

L'ensemble des isolats croissent sur les milieux TSA, King B et GYM. Les numérations bactériennes (log UFC/g) ont révélé que la charge des bactéries rhizosphériques est plus importante que celles des bactéries non rhizosphériques et des bactéries endophytes, sur les différents milieux de cultures utilisés (Fig.11A).

Les taux des isolats présentant une activité antifongique envers FOA sont représentés dans la Fig. 11B. Sur 335 isolats, 75 sont capables d'inhiber la croissance du FOA, *in vitro*. Les résultats ont montré que 19.84%, 26.37%, 17.74%, 27.27% et 26.08% des souches actives sur le FOA sont isolées, respectivement, à partir du sol rhizosphérique sain, infecté, sol non rhizosphérique et des racines saines et infectées. En effet, le nombre de bactéries endophytes et rhizosphériques antagonistes est supérieur à celui des bactéries non rhizosphériques.



A



B

Fig. 11 : (A) Dénombrement des souches bactériennes isolées à partir du sol rhizosphérique sain (HRh) et infecté (IRh), sol non rhizosphérique (SNRh) et à partir des endophytes saines (HR) et infectées (IR) dans des différents milieux de cultures (TSA, GYM et King B). (B) Le taux des isolats actifs envers FOA par site d'isolement (HRh, IRh, SNRh, HR et IR).

3-1-2- Potentialités antifongiques des souches sélectionnées

Parmi les 75 bactéries actives envers le FOA, 8 souches bactériennes les plus performantes (83, 84, 300, 333, 322, 260, 249 et 227) présentant de meilleur taux d'inhibition envers FOA, *in vitro*, sont sélectionnées. Ces souches bactériennes sont testées pour leur activité antifongique envers différentes souches de FOA (FOA1, FOA2, FOA3, FOA4, FOA5) ainsi que d'autres champignons phytopathogènes (Aa, Pi, Fs et Fg). Les résultats ont montré que toutes les souches bactériennes ont une action inhibitrice vis-à-vis des champignons testés. Les souches 333, 84 présentent un potentiel inhibiteur très élevé envers les souches de FOA par rapport aux autres souches bactériennes. Un taux d'inhibition maximal de 52.94% est observé chez la souche 333 envers FOA 5 (Fig. 12A,13). Il s'est avéré que la souche 84 est plus efficace pour inhiber significativement ($P < 0.05$) la croissance des souches de FOA1, FOA2 et FOA4 respectivement avec des inhibitions de 48.61%, 46.88% et 42.85%. Ainsi, FOA3 est plus sensible à l'action antagoniste exercé par la souche 333 (48.22%). En revanche, de faibles activités antagonistes sont notées par les souches 322 et 83 envers toutes les souches de FOA.

Les deux antagonistes 333 et 249 inhibent le développement des champignons phytopathogènes (Aa, Fg, Fs, Pi) avec des taux supérieurs à 38% (Fig. 12B,14). De plus, les taux d'inhibition ont atteint 47.67% contre Aa (souche 333), 43.24% envers Fg (souche 249), 41.81% envers Pi (souche 260) et 40% contre Fs (souches 322 et 249) ($P < 0.05$). Tandis qu'un faible potentiel antagoniste est constaté chez les souches 322 et 83 envers Fg (6.72 %) et Fs (10%), respectivement.

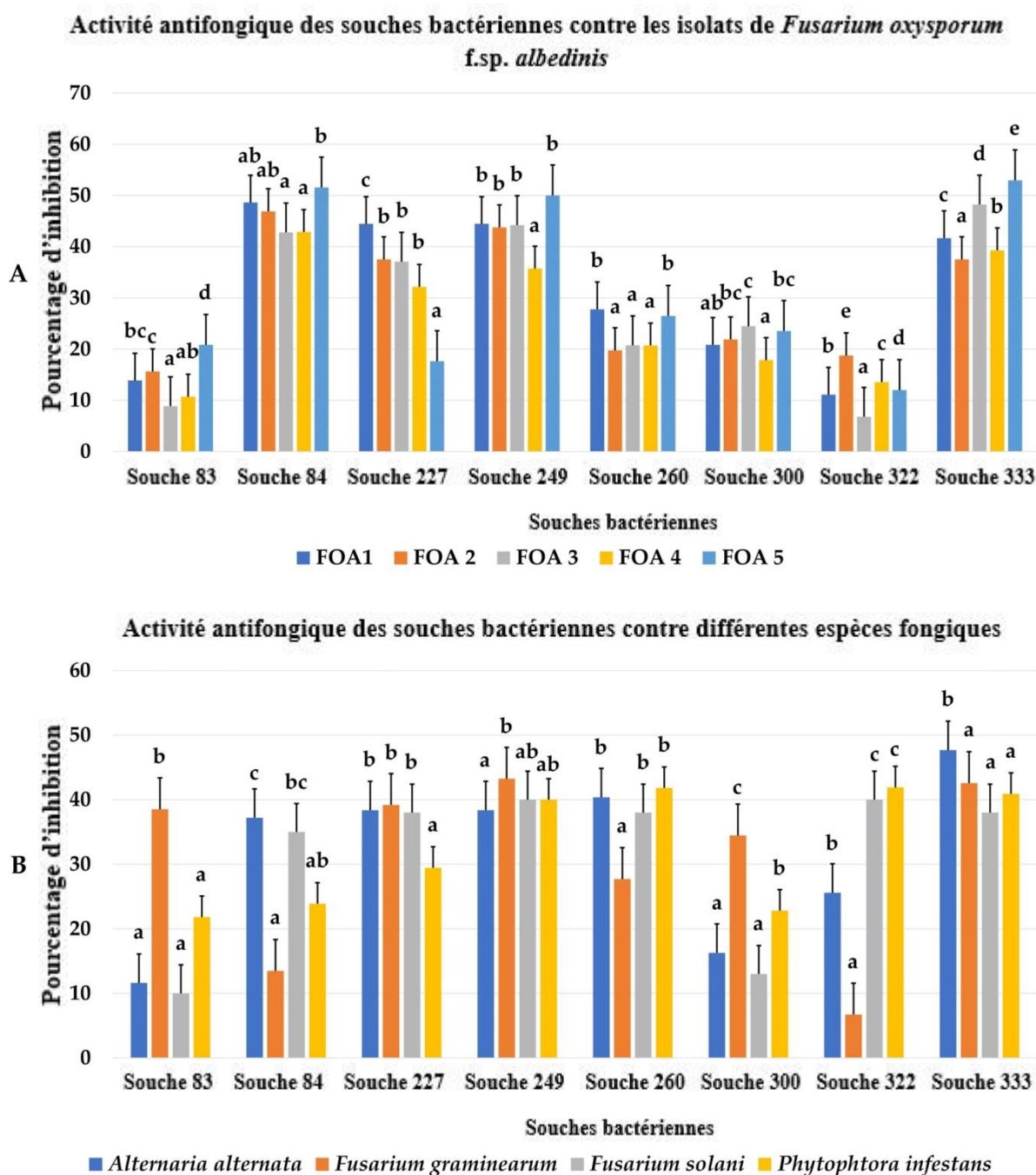


Fig. 12 : (A) Pourcentage d'inhibition des souches bactériennes sélectionnées (83, 84, 227, 249, 260, 300, 322 et 333) envers différentes souches de *Fusarium oxysporum* f. sp *albedinis* (FOA1, FOA2, FOA3, FOA4 et FOA5). (B) Taux d'inhibition des souches bactériennes contre différentes espèces de champignons phytopathogènes (*Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora infestans*). Les barres à moustaches = erreur standard. Différentes lettres entre les barres de chaque groupe indiquent une différence significative à ($P < 0,05$) déterminée par ANOVA avec la comparaison des moyennes utilisant le HSD de Tukey.

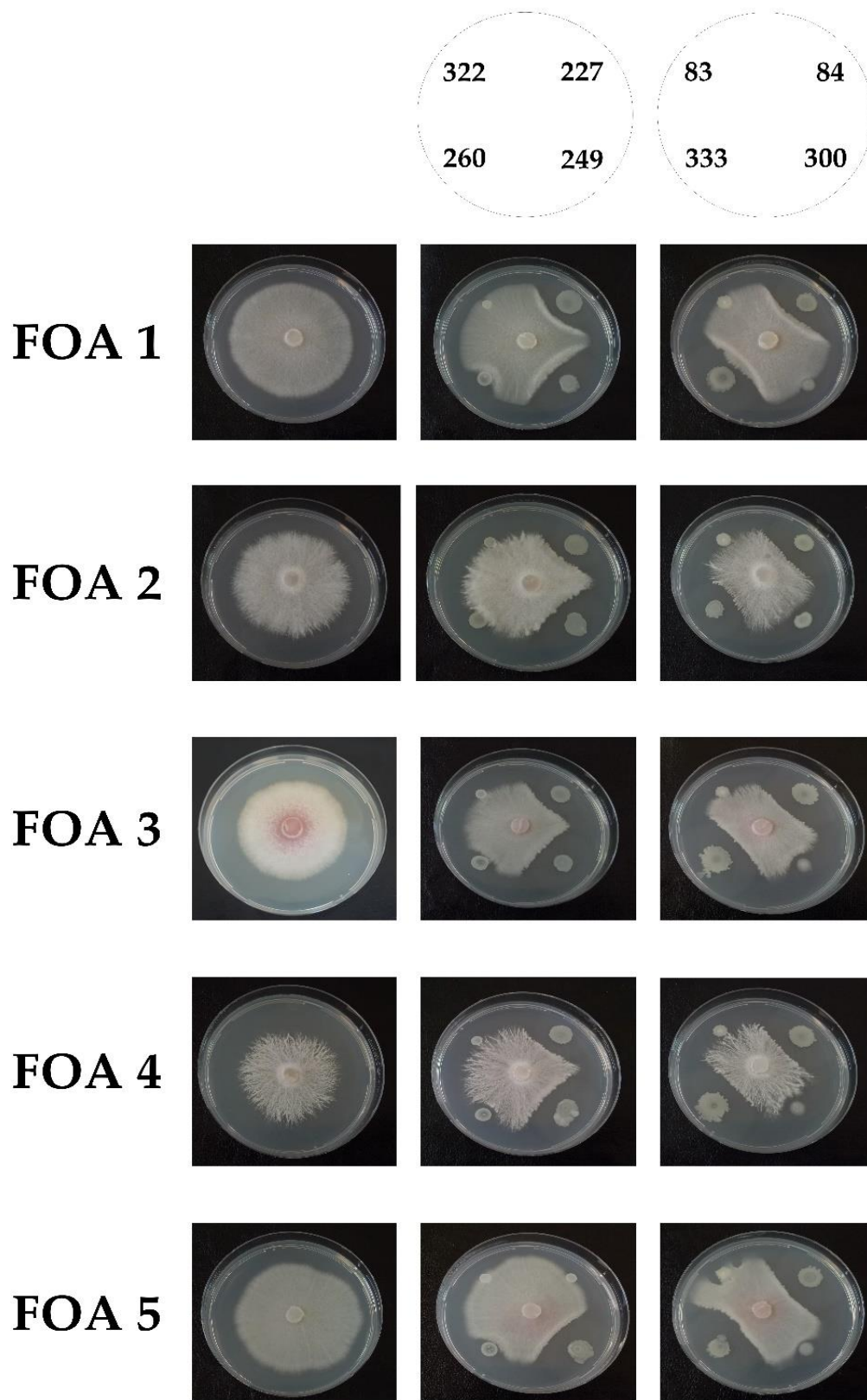


Fig. 13 : Test de confrontation *in vitro* de l'activité antifongique des souches bactériennes envers les différentes souches de *Fusarium oxysporum* f. sp *albedinis* (FOA1, FOA2, FOA3, FOA4 et FOA5).

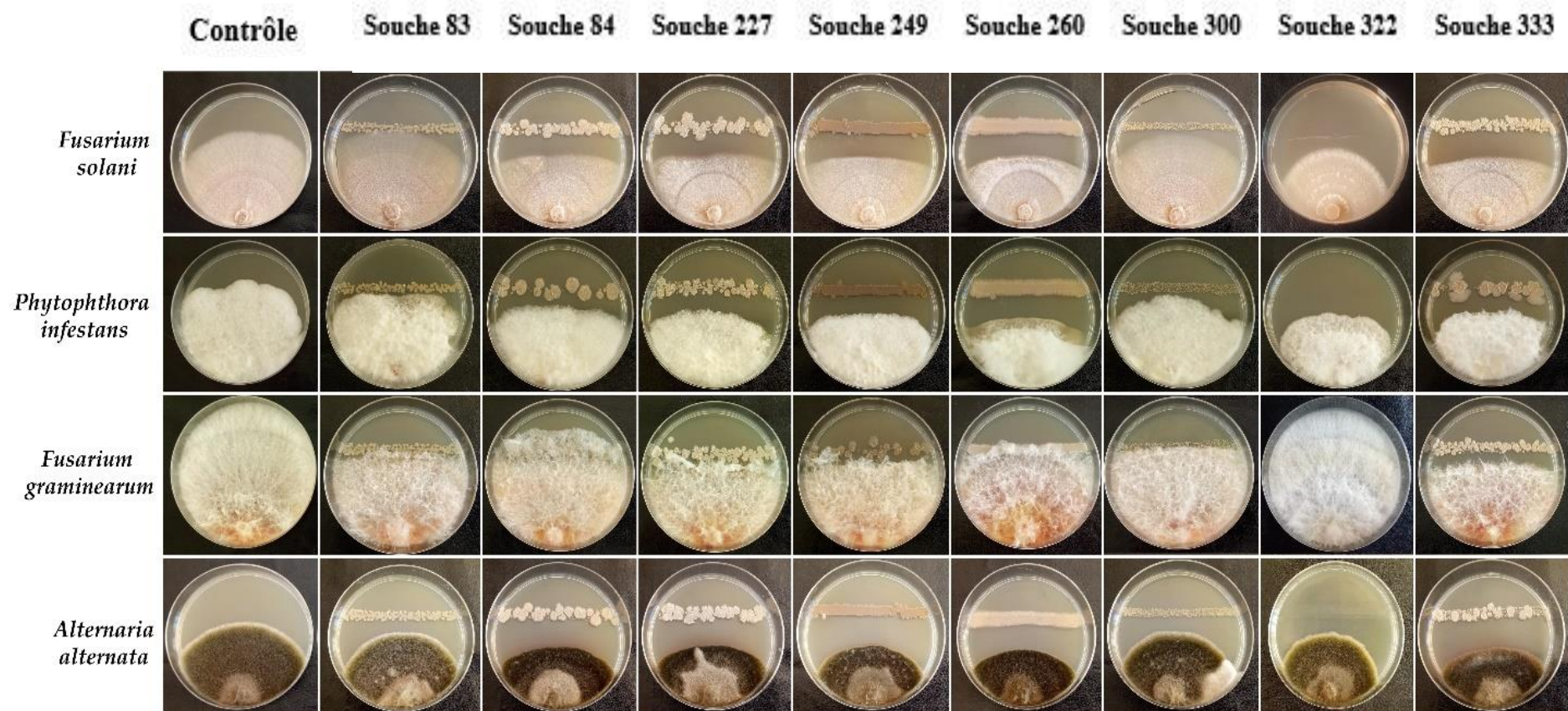


Fig. 14 : Test de confrontation *in vitro* de l'activité antifongique des souches bactériennes envers différentes espèces de champignons phytopathogènes (*Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora infestans*).

3-1-3- Identification moléculaire des souches bactériennes et leurs positions phylogénétiques

L'arbre phylogénétique basé sur la comparaison des séquences d'ADNr 16S des souches (227, 300, 249, 333, 83, 84, 322 et 260) avec les séquences similaires des souches disponibles dans les bases de données (GenBank) a permis de confirmer que toutes les souches les souches appartiennent au genre *Bacillus* (Fig. 15). Les souches 227, 300 et 249 présentent une homologie avec *Bacillus subtilis*. Les souches 333, 83 et 84 sont identifiées comme étant respectivement *Bacillus* sp, *B. atrophaeus* et *B. halotolerans*. En revanche, 322 et 260 sont respectivement apparentés aux espèces *B. amyloliquefasiens* et *B. paralicheniformis*. Leurs séquences sont soumises dans GenBank et les numéros d'accès sont implicites dans l'arbre. La souche JYCB351 de *B. thuringiensis* est utilisée comme hors groupe.

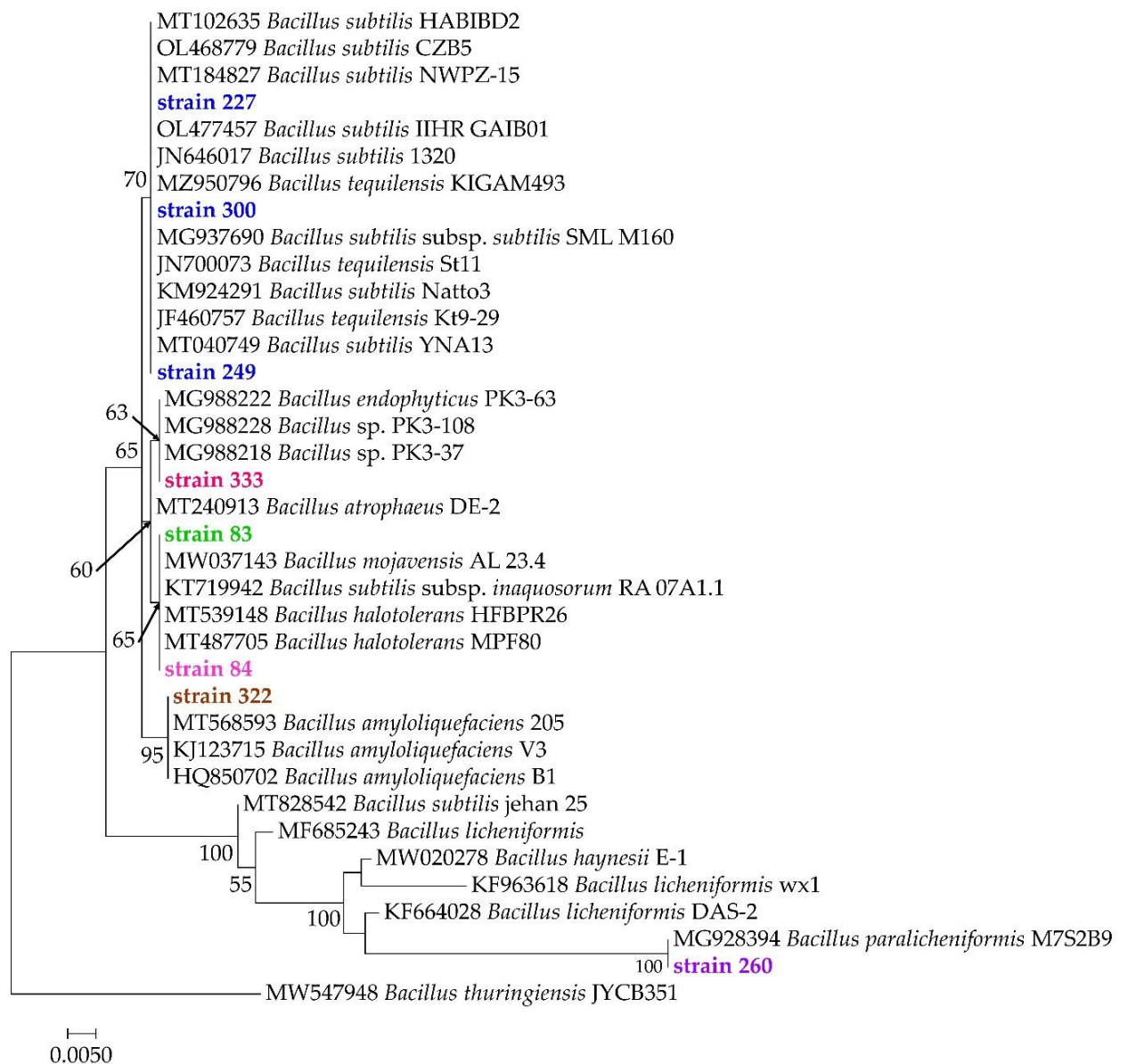


Fig. 15 : Arbre phylogénétique à maximum de vraisemblance des souches de *Bacillus* (227, 300, 249, 333, 83, 84, 322 et 260) basés sur la comparaison de la séquence de l'ARNr 16S des souches bactériennes avec certaines souches phylogénétiquement proches. Les supports pour les branches ont été évalués par un rééchantillonnage bootstrap de l'ensemble de données avec 1000 répétitions.

3-1-4- Effet de la coculture bactérienne sur la croissance du FOA

L'activité antifongique des souches bactériennes sous forme combinées envers FOA 1 *in vitro* est représentée dans les Fig. 16 et 17. Le pouvoir antagoniste de la coculture des différentes souches bactériennes a montré des taux d'inhibition supérieur ou égale à 37,90 %. L'effet antagoniste de la coculture des souches bactériennes a montré des taux d'inhibition de 58,77 %, 58,17 %, 54,77 %, 53,17 % et 53,12 % ($P < 0,05$) pour les combinaisons 333+83, 333+249, 260+249, 83+260 et 300+84 respectivement. En revanche, un faible taux d'inhibition non significatif de 37,98% est estimé par les souches 300+83 envers FOA.

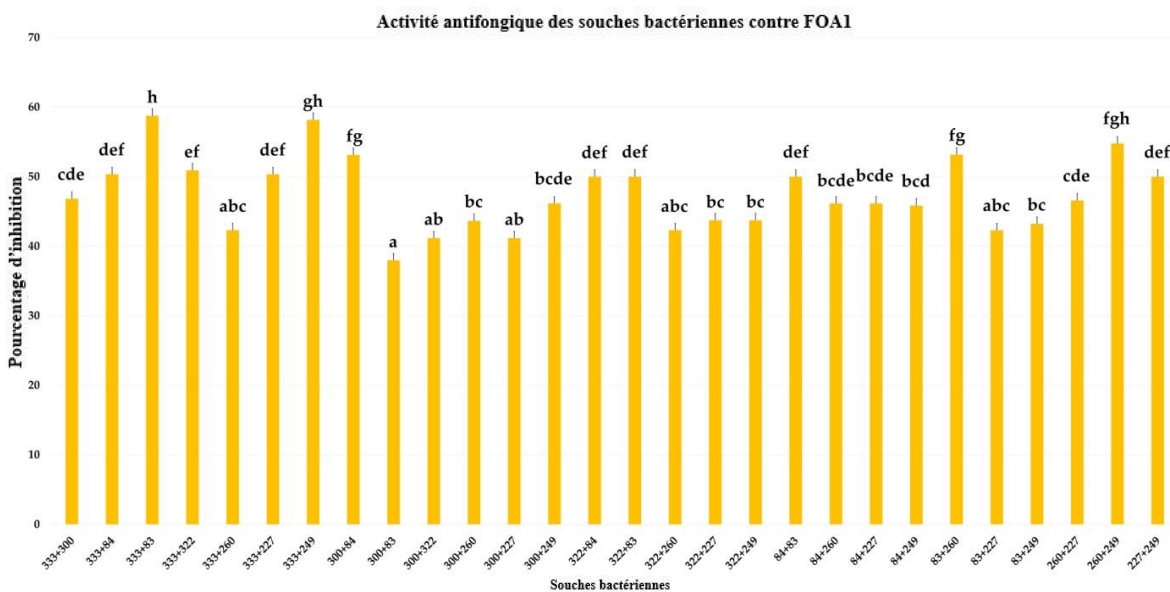


Fig. 16 : Pourcentage d'inhibition des souches bactériennes combinées envers FOA 1.

Les barres à moustaches = erreur standard. Différentes lettres entre les barres de chaque groupe indiquent une différence significative à ($P < 0,05$) déterminée par ANOVA avec la comparaison des moyennes utilisant le HSD de Tukey.

Contrôle |



83

83+227

227



83

83+260

260



83

83+249

249



84

84+83

83



84

84+227

227



84

84+249

249



84

84+260

260



84

84+322

322



249

249+227

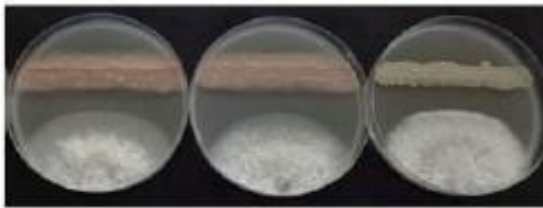
227



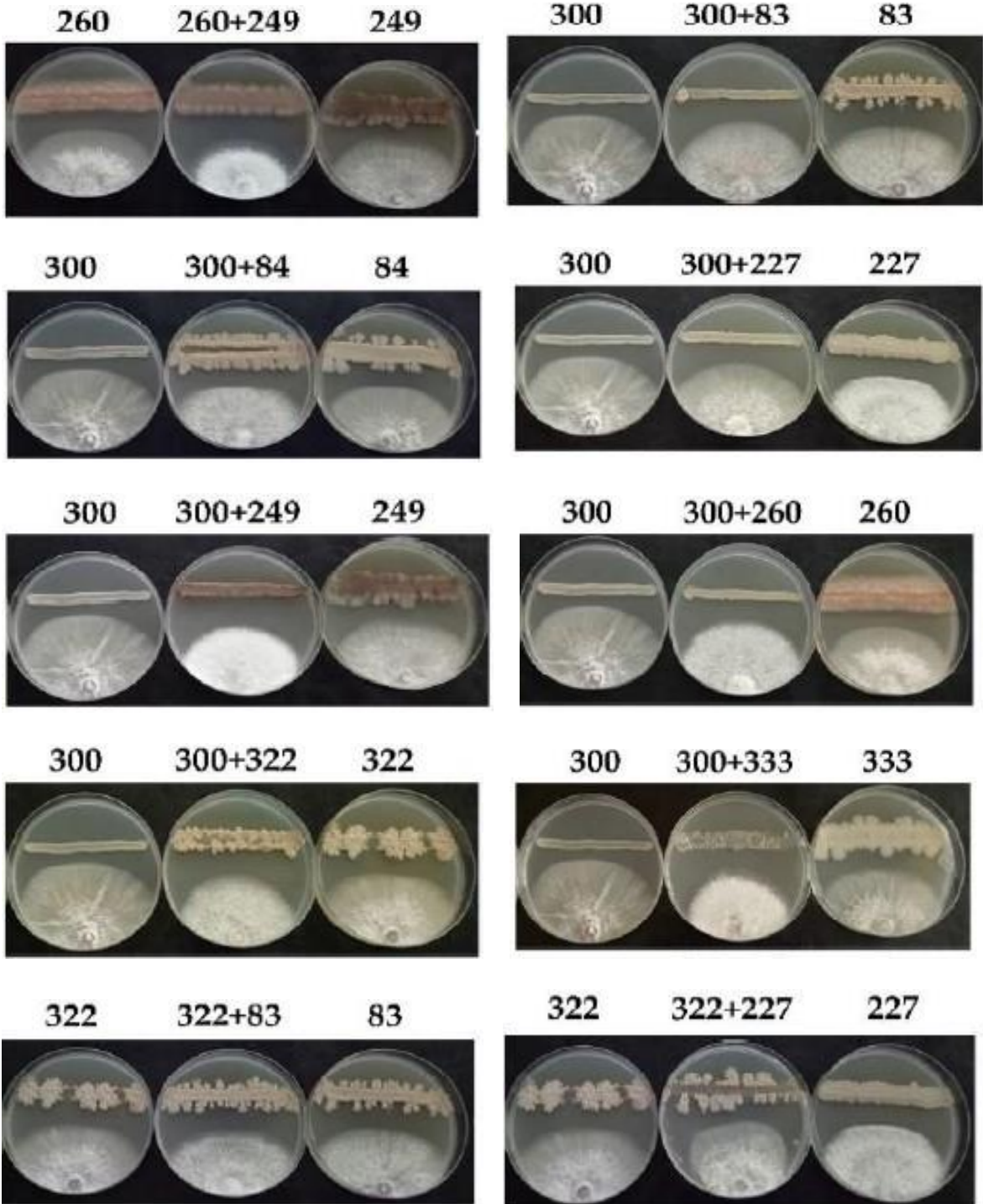
260

260+227

227



Contrôle



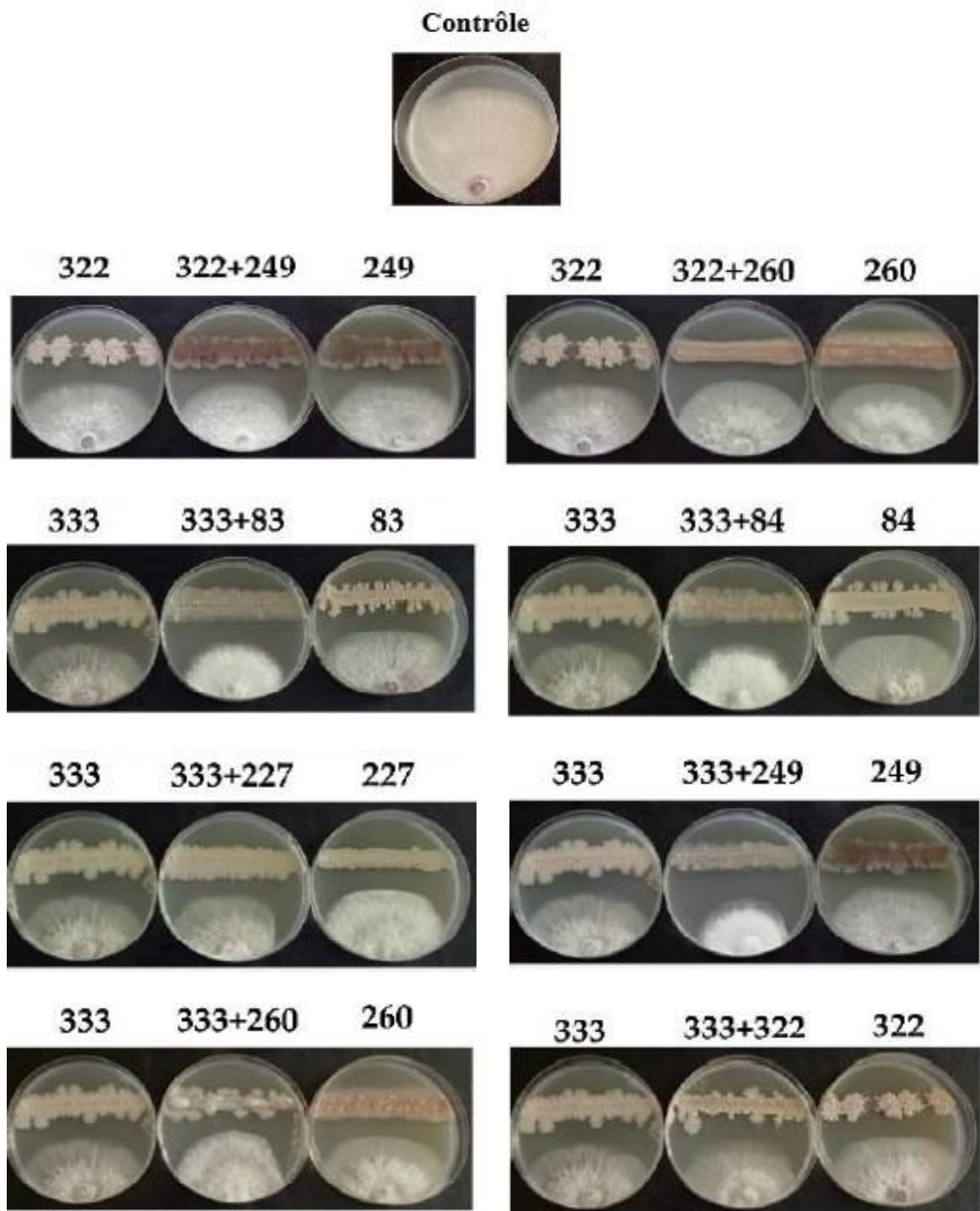


Fig. 17 : Test de confrontation, *in vitro*, de l'activité antifongique des souches bactériennes combinées envers FOA 1. Une boîte de Pétri témoin est présentée en dessus.

3-1-5- Effet des surnageants bactériens sur la croissance du FOA

Les résultats ont montré que les surnageants des différentes souches bactériennes seule ou combinées ont un effet inhibiteur sur la croissance du FOA. Comme il est indiqué dans les Fig. 18 et 19, une meilleure activité inhibitrice est prouvée par les surnageants des souches 84+249 (43.69%), 333+249 (42.85%), 84 (42.85%), 249 (42.12%), 333+83 (42.10%) et 333(41.92%) ($P < 0.05$). Par contre, les plus faibles taux d'inhibitions de 7.14% et 6.77% sont constatés par les surnageants des souches 322+83 et 300 respectivement.

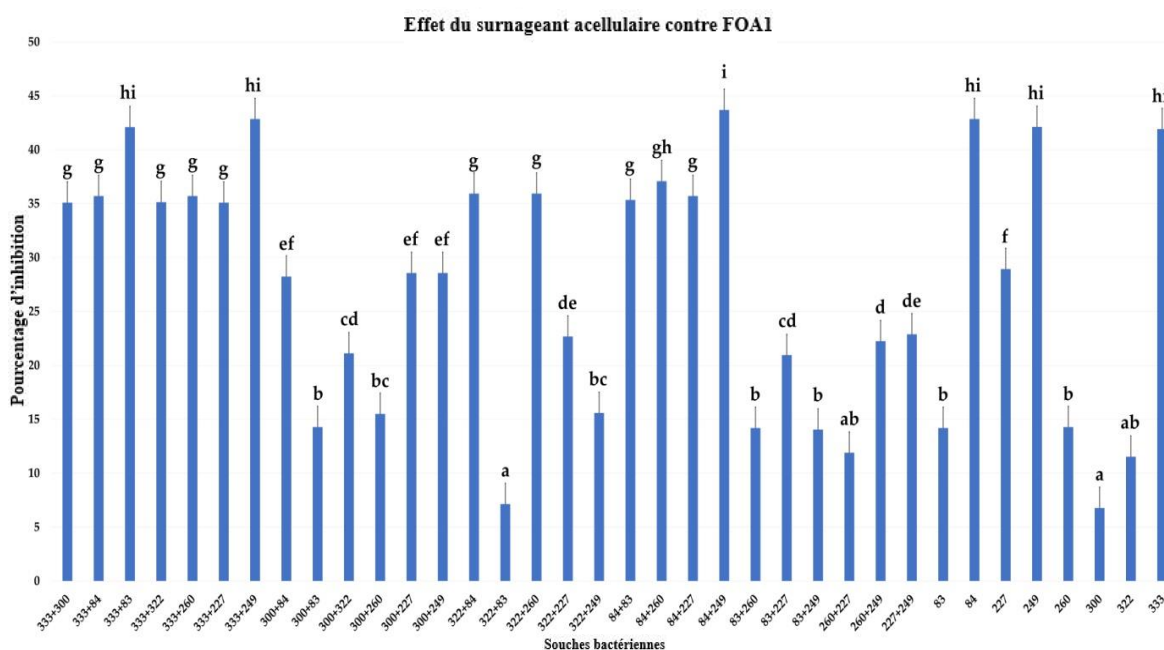
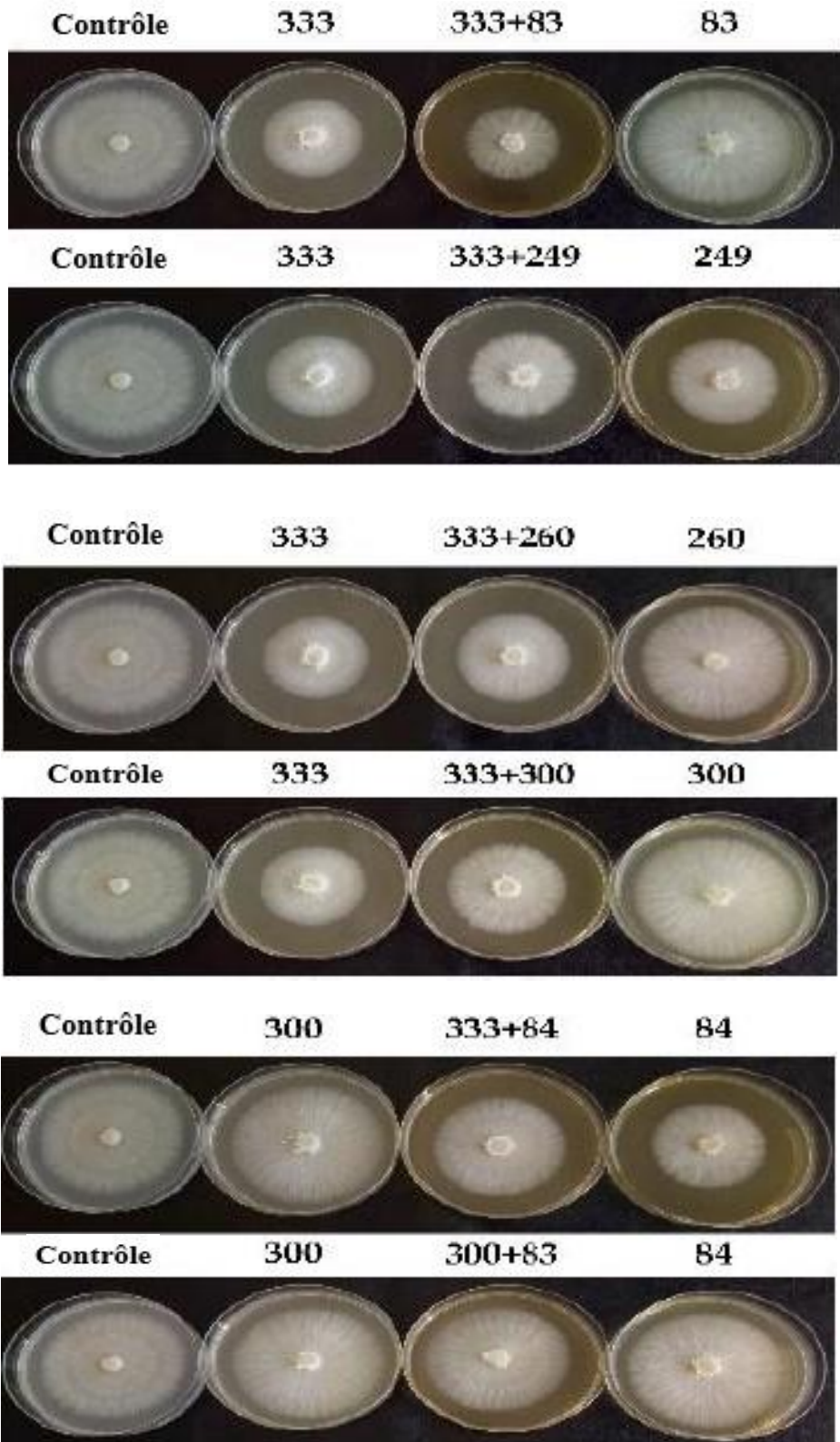


Fig. 18 : Taux d'inhibition de la croissance du FOA 1 sur gélose PDA contenant les surnageants des différentes souches bactériennes seules ou combinées. Les barres à moustaches = erreur standard. Différentes lettres entre les barres de chaque groupe indiquent une différence significative à ($P < 0,05$) déterminée par ANOVA avec la comparaison des moyennes utilisant le HSD de Tukey.



Contrôle **333** **333+322** **322**



Contrôle **333** **333+227** **227**



Contrôle **333** **333+84** **84**



Contrôle **300** **300+322** **322**

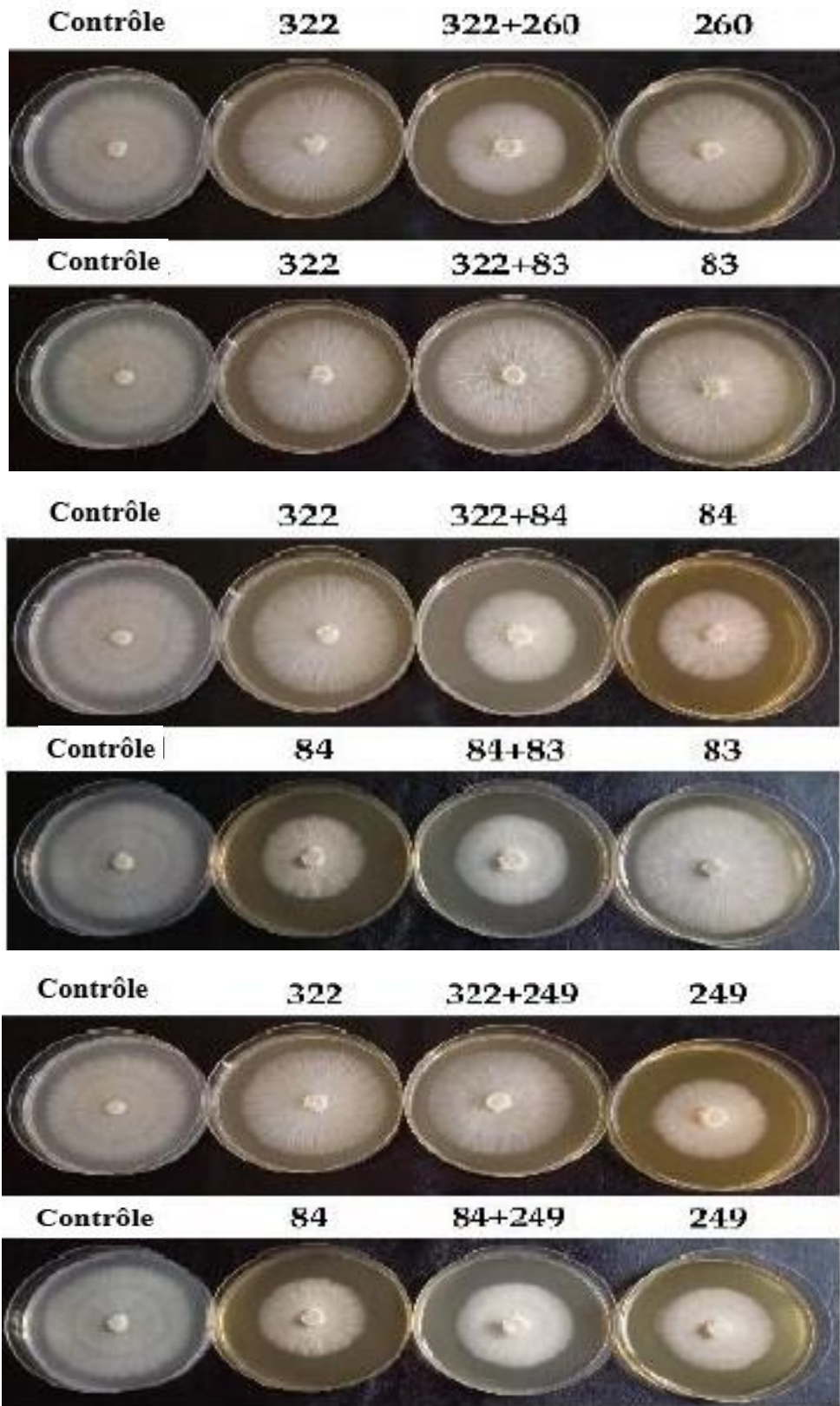


Contrôle **300** **300+249** **249**



Contrôle **300** **300+260** **260**







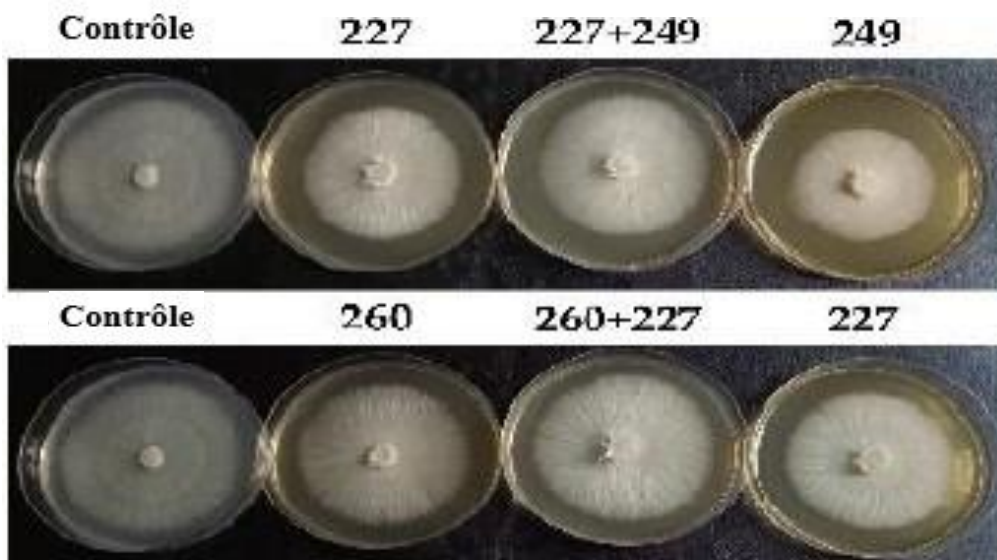
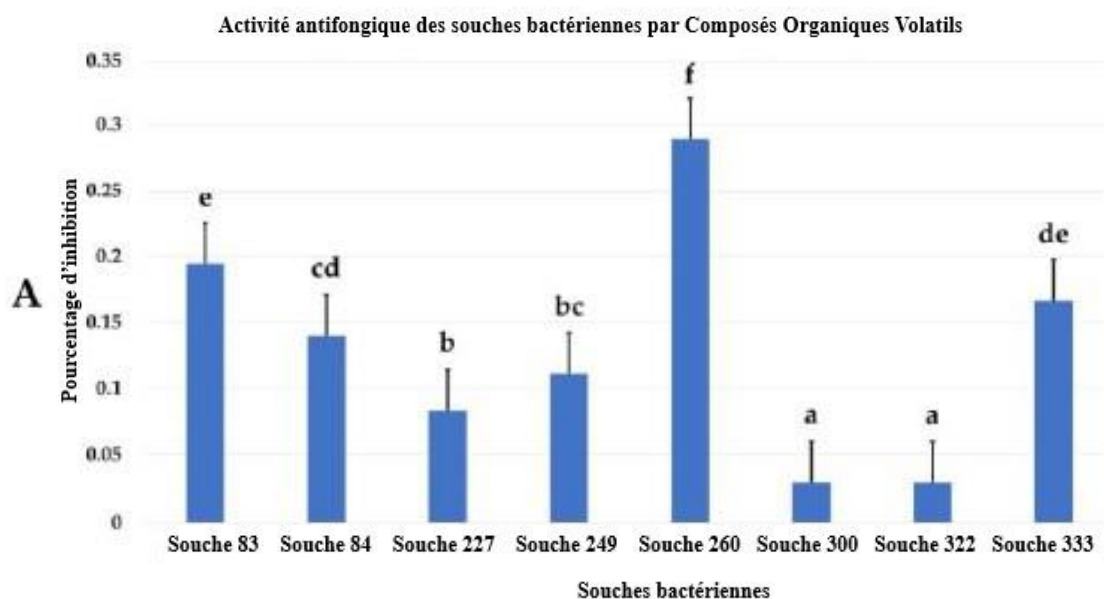


Fig. 19 : Effet des différents surnageants bactériens seuls ou combinés *in vitro* sur la croissance du FOA 1.

3-1-6- Activité antifongique par les substances organiques volatiles (VOCs)

L'effet des VOCs produits par les souches bactériennes sur la croissance mycélienne de FOA1 a montré une faible inhibition. Cependant, les substances volatiles sécrétées par la souche 260 ont montré un bon taux d'inhibition de 28,89 % par rapport à ceux des autres souches bactériennes (Fig. 20 A, B). Par ailleurs, une très faible inhibition de 2.4 % est notée par les VOCs produites par les souches 300 et 322.



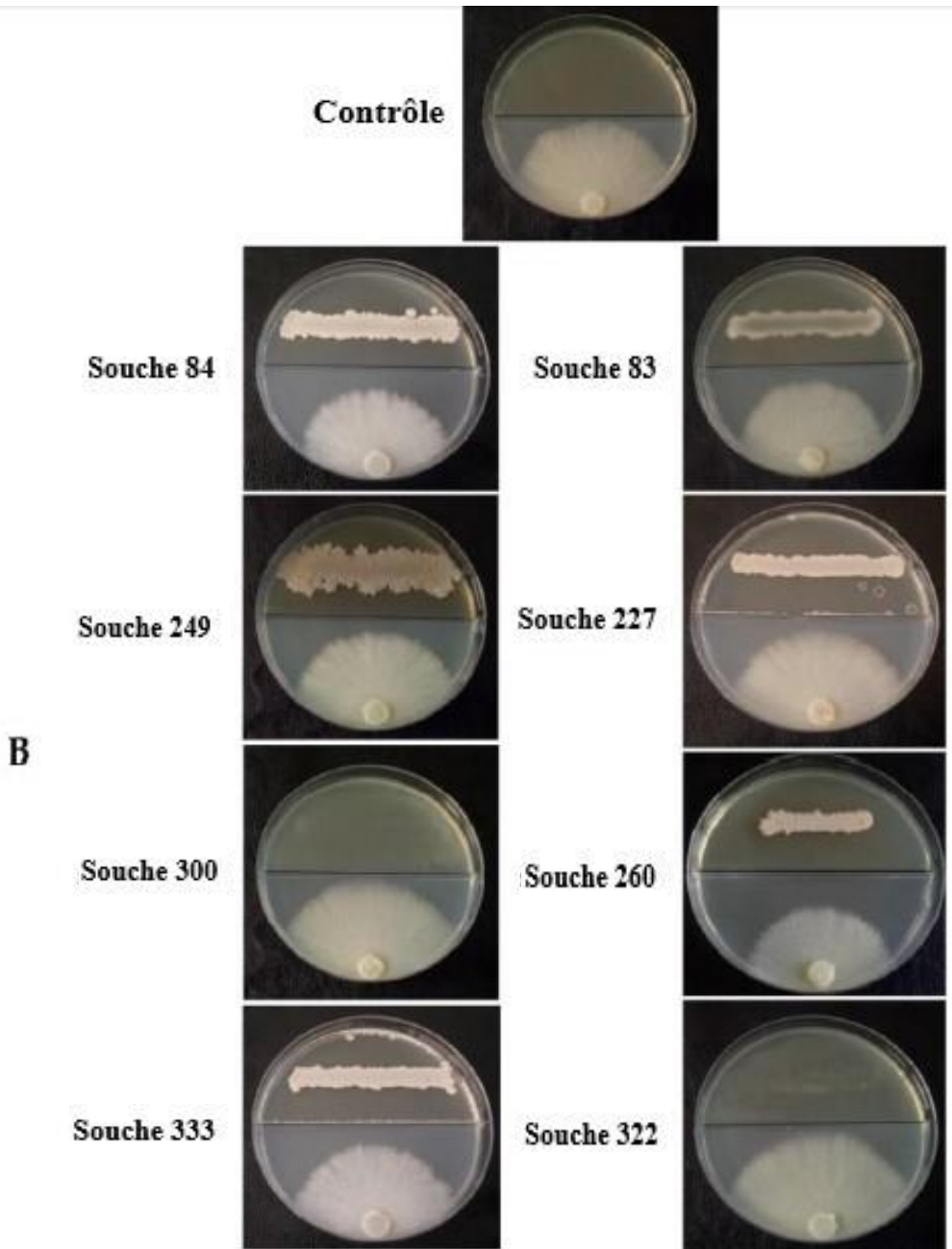
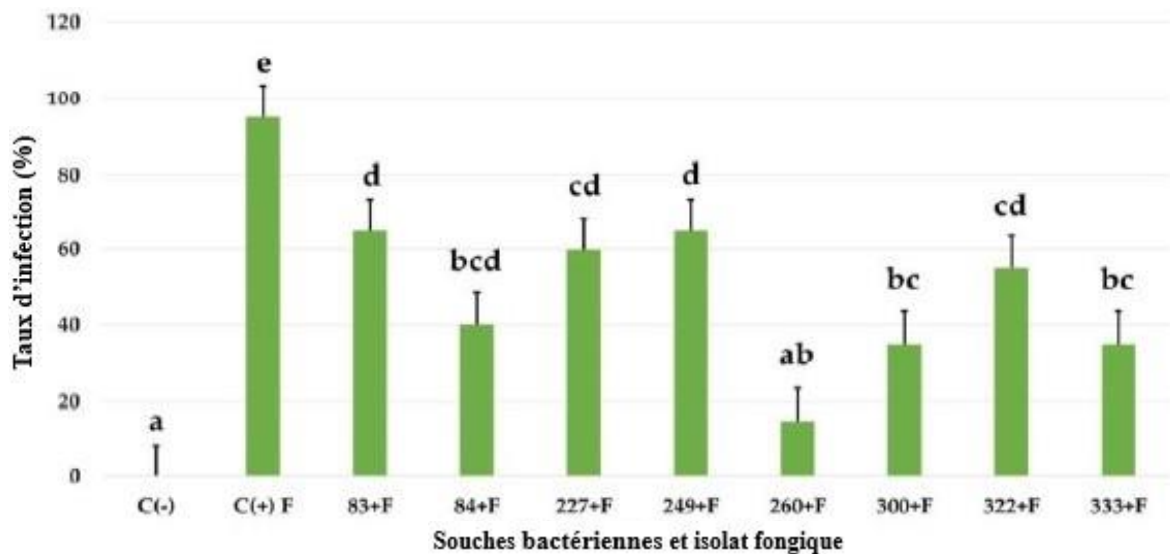


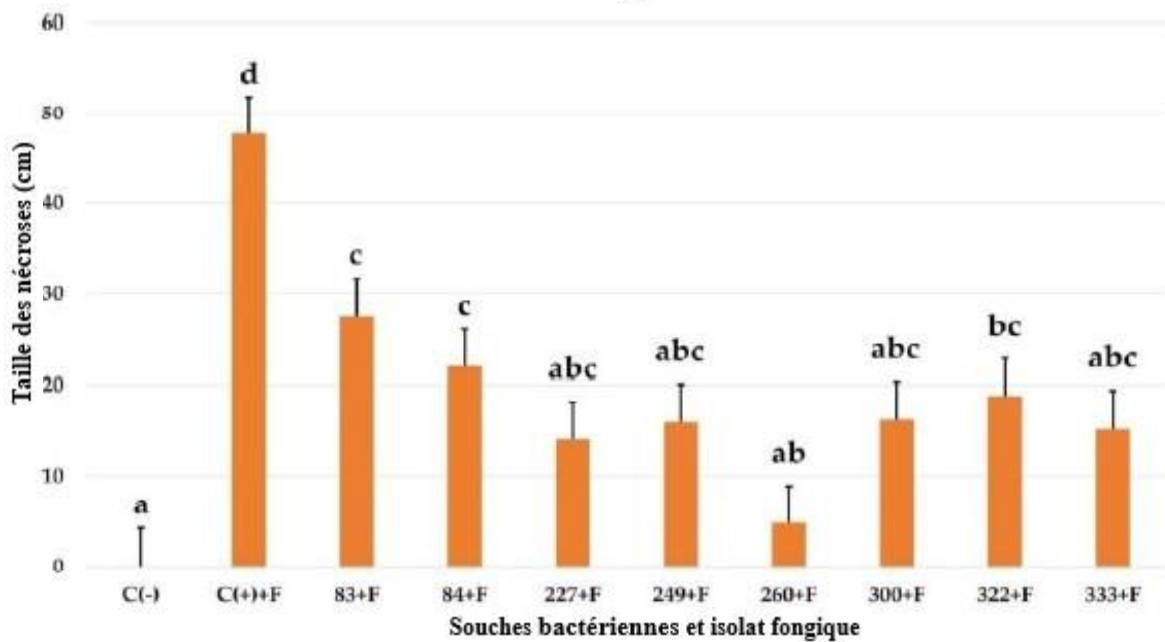
Fig. 20 : (A) Pourcentage d'inhibition des substances volatiles (VOCs) produites par les souches bactériennes envers FOA. (B) L'effet antifongique *in vitro* des VOCs produites par les souches bactériennes sur la croissance mycélienne du FOA. Les barres à moustaches = erreur standard. Différentes lettres entre les barres de chaque groupe indiquent une différence significative à ($P < 0,05$) déterminée par ANOVA avec la comparaison des moyennes utilisant le HSD de Tukey.

3-1-7- Test de biocontrôle, *in vivo*, sur les graines du palmier dattier

La capacité des souches bactériennes à inhiber la croissance de FOA1 est réalisée, *in vivo*, sur les graines germées de la variété de palmier dattier Deglet Nour. Le degré de protection évalué par le taux d'infection et l'ampleur de la nécrose racinaire a montré que la majorité des souches offrent une faible protection contre l'infection par FOA1 (Fig. 21). Cependant, les graines traitées avec la souche 260 ont réduit de manière significative ($P < 0,05$) le taux d'infection à 15 % (Fig. 21 A) et la taille de la nécrose à 4,7 cm (Fig. 21 B). Selon les résultats, les souches 84, 300 et 333 protègent les graines germées d'environ 60 %, mais les autres souches 83, 227, 249 et 322 présentent un degré de protection inférieur (Fig. 21 C).



A



B

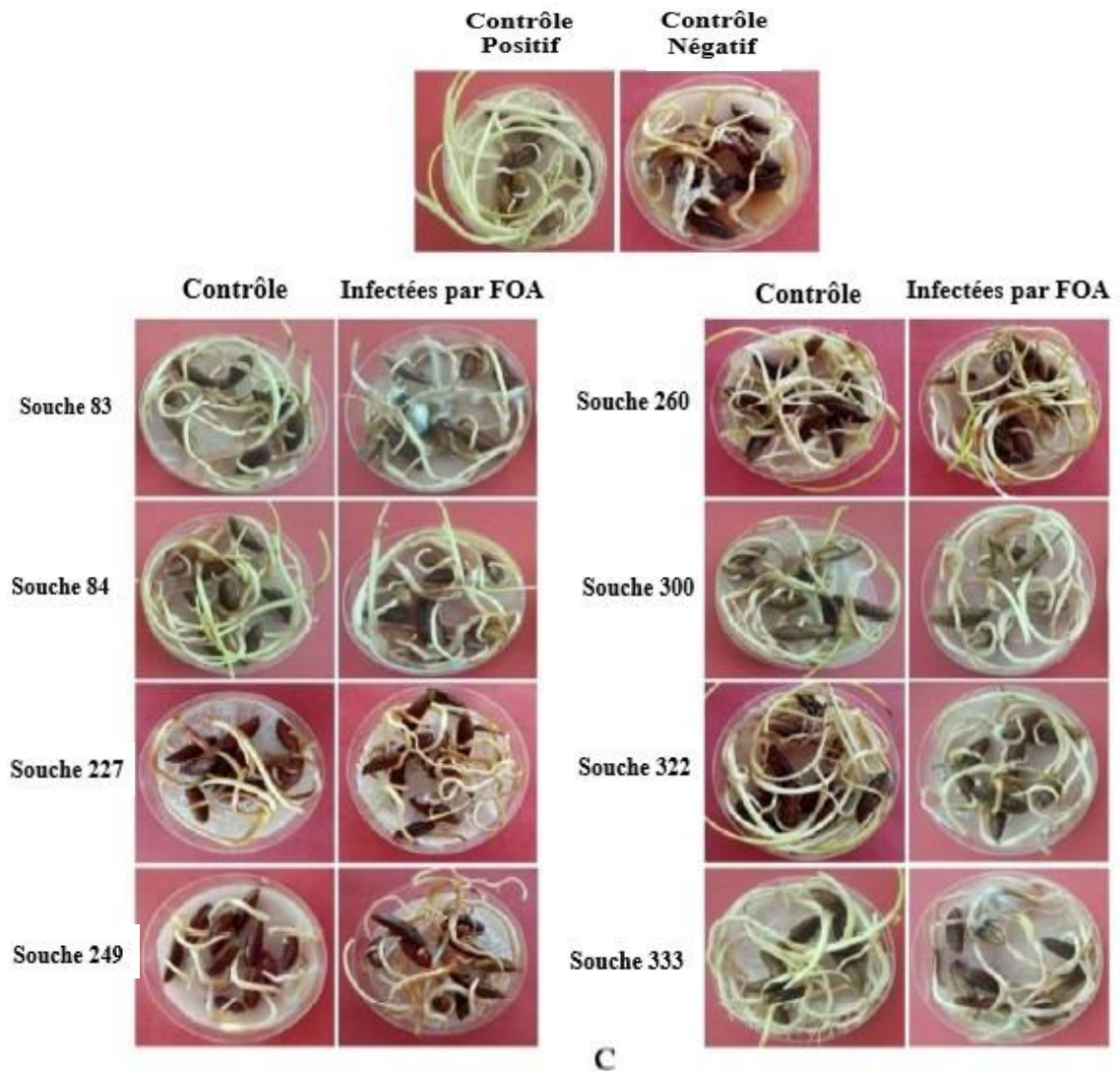


Fig. 21 : (A) Taux d'infection (%), (B) la taille des nécroses racinaires (cm) des graines du palmier dattier. Les barres à moustaches = l'erreur standard. Les différentes lettres entre les barres de chaque groupe indiquent une différence significative à ($P < 0,05$) déterminées par ANOVA avec une comparaison de moyennes à l'aide de HSD de Tukey. **(C) Test de biocontrôle *in vivo* des graines de palmier dattier infectées par le FOA et traitées en même temps avec les différentes souches bactériennes.** Les graines considérées comme des témoins négatif et positif sont représentées en dessus.

3-1-8- Potentialités PGP des bactéries sélectionnées

Les résultats des activités PGP des différentes souches bactériennes sont présentés sur la Fig. 22. Toutes les souches ont produit de l'AIA à des taux variables allant de 3.89 à 14.12 $\mu\text{g/ml}$. Le maximum est observé chez la souche 260 (14.12 $\mu\text{g/ml}$) (Fig.22 A).

La majorité des souches ont produit des sidérophores à l'exception des souches 333 et 83. En effet, la production varie de 1.14 à 76.23% (Fig.22 B). La souche la plus performante est la 249 (76.23%) suivi par 84 (43.4%) et 227 (42.26%).

La quantité de P_2O_5 produite par les souches varie de 36.86 à 195.88 mg/ml (Fig.22 C). La concentration maximale de P_2O_5 soluble est observée chez la souche 322 (195.88 mg/ml), la 300 (180,75 mg/ml), la 83 (176,31 mg/ml) et la 333 (173,55 mg/ml).

Ainsi, toutes les souches ont pu fixer l'azote et produire de l'ammoniac. Néanmoins, elles n'ont pas réussi à produire de l'HCN (Fig.22 D).

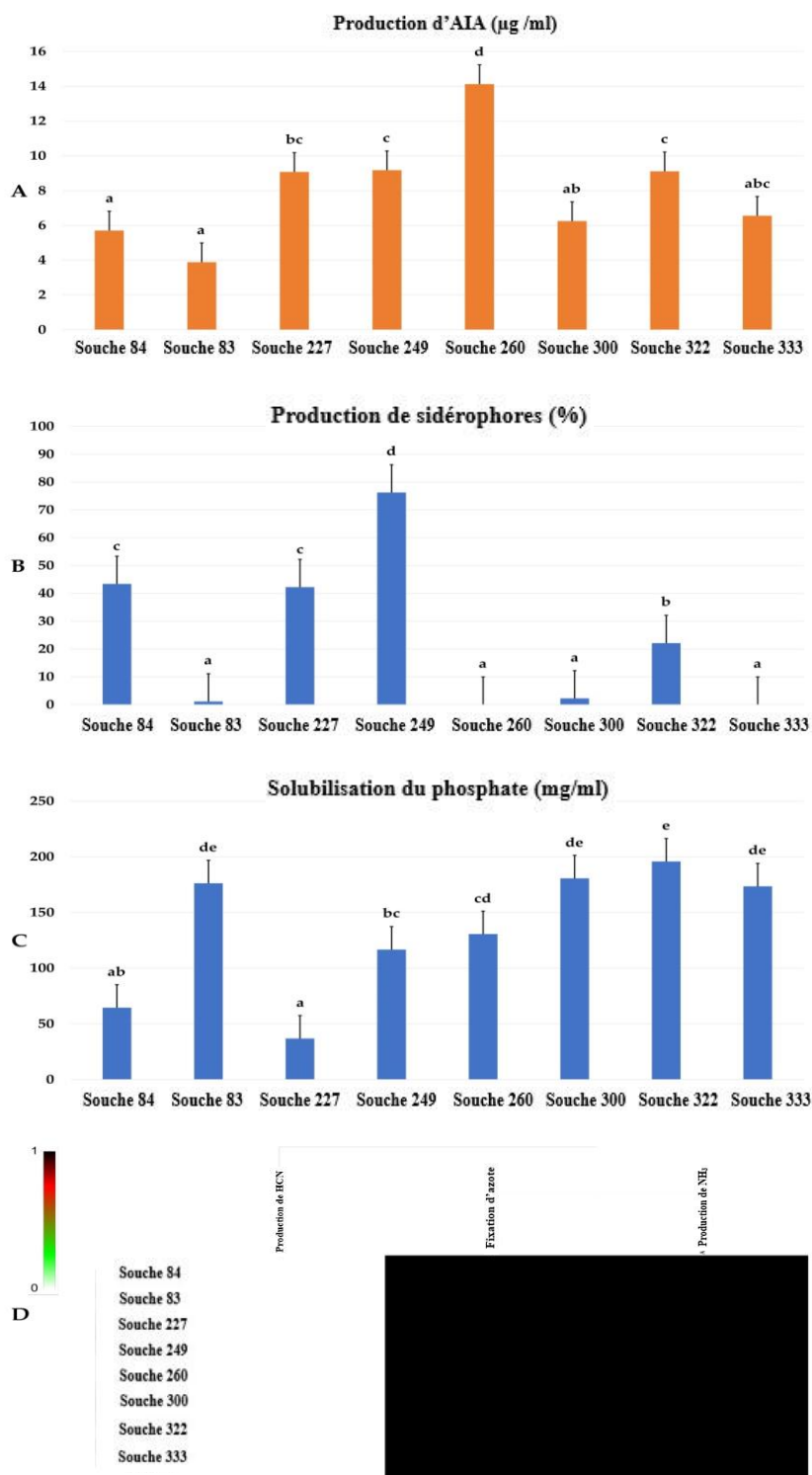


Fig. 22 : Activités PGP des différentes souches bactériennes. (A) Production de l'AIA (µg/ml). (B) Production des sidérophores (%). (C) Solubilisation des phosphates (mg/ml). Les barres à moustaches = l'erreur standard. Les différentes lettres entre les barres de chaque groupe indiquent une différence significative à ($P < 0,05$) déterminées par ANOVA avec une comparaison de moyennes à l'aide de HSD de Tukey. (D) Production de HCN, fixation d'azote et la production de NH₃.

3-1-9- Production d'enzymes

Les activités enzymatiques sont détectées par mesure des halos de production autour des colonies bactériennes (Fig. 23). Les résultats ont montré que toutes les souches sont capables de produire les différentes enzymes testées sauf certaines souches (83, 300, 322) qui n'ont pas réussi à produire la protéase. Dans un autre côté, la production de la chitinase par les souches est plus élevée par rapport aux autres enzymes.

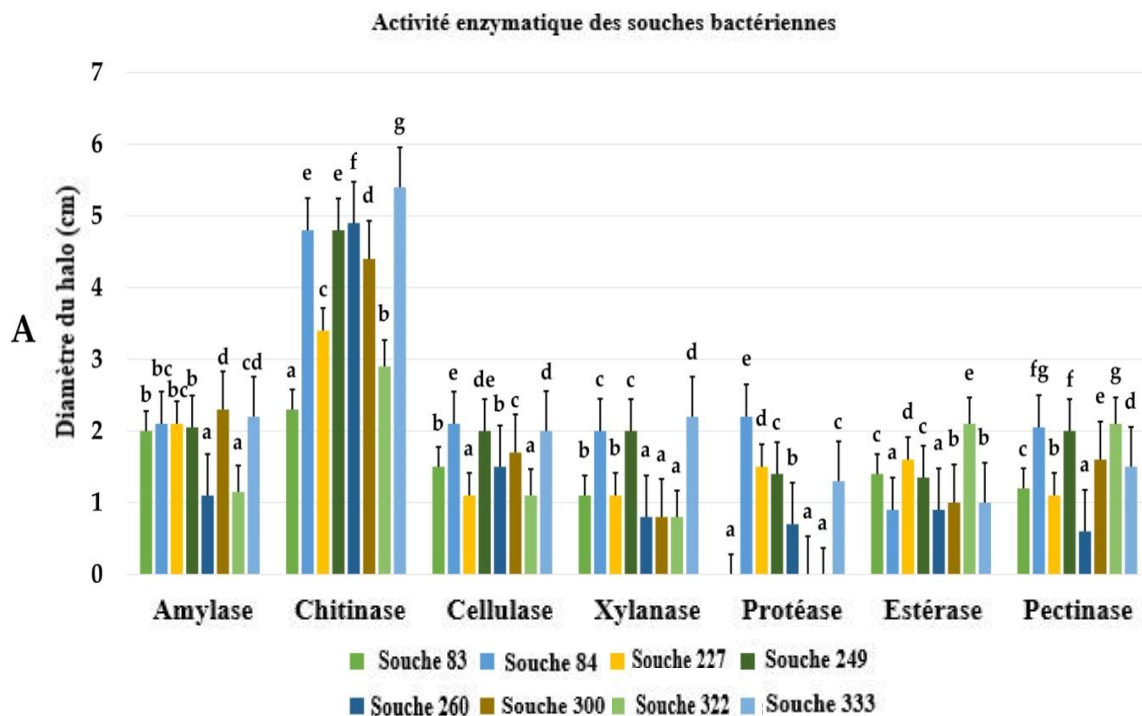


Fig. 23 : Production d'enzymes par les souches bactériennes. Les barres à moustaches = l'erreur standard. Les différentes lettres entre les barres de chaque groupe indiquent une différence significative à ($P < 0,05$) déterminées par ANOVA avec une comparaison de moyennes à l'aide de HSD de Tukey.

3-1-10- Effet du sel, du pH, du PEG et de la température sur la croissance des souches bactériennes

Les souches bactériennes sont testées pour leurs capacités à tolérer les différents stress abiotiques. La majorité des souches se sont développées à des concentrations de sel de 0 à 400 mM (Fig.24A). Cependant, les souches 249, 260, 227, 84 et 333 tolèrent des concentrations jusqu'à 1200 mM de NaCl. Ainsi, l'effet osmotique des différentes concentrations de PEG₈₀₀₀ sur la croissance des souches bactériennes est documenté dans

la Fig. 24B. La plupart des souches étudiées sont osmotolérantes à des concentrations de 10% de PEG₈₀₀₀. Seulement les souches 249, 260, 333, 84 et 227 ont pu croître à des concentrations de 20% de PEG₈₀₀₀. Aucune croissance n'est observée au-delà de cette concentration.

Toutes les souches ont montré une capacité de croissance à des valeurs élevées de pH (pH9 et 11) excepté la 83 qui ne tolère pas de pH supérieur à 9 (pH11). Un effet négatif de l'acidité est constaté sur la croissance des souches bactériennes (Fig. 24C).

De plus, la croissance des souches est constatée à des températures de 20 à 37° C. En revanche, certaines souches (249, 260, 333, 84, 227) peuvent tolérer des hautes températures allant jusqu'à 50°C. Les basses températures (4°C et 10°C) affectent négativement leur croissance (Fig.24 D).

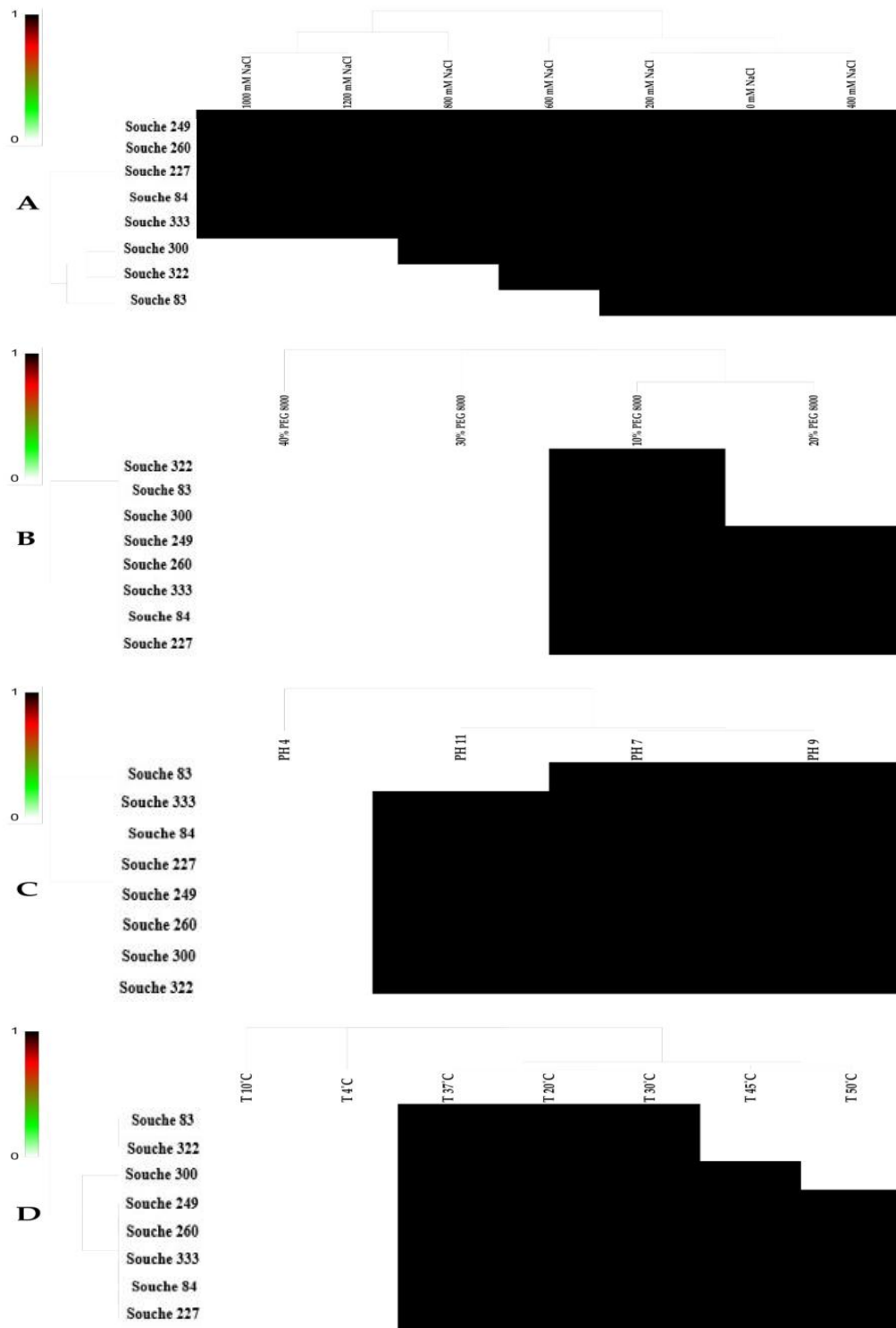


Fig. 24 : (A) Effet des différentes concentrations de NaCl, (B) de PEG₈₀₀₀, (C) différentes valeurs de pH et (D) la température sur la croissance des souches bactériennes.

3-1-11- Détermination de la résistance aux métaux lourds

L'effet des différentes concentrations de métaux lourds (Hg, Pb, Cd, Co) sur la croissance des souches bactériennes est illustré dans la Fig. 25. Uniquement la souche 333 a pu résister jusqu'à 500 ppm de mercure en présentant un diamètre de croissance de 0.35 cm. Plus que la moitié des souches ont toléré jusqu'à 1000 ppm de plomb avec une meilleure croissance constatée pour la souche 249 (1.1 cm). Concernant le cadmium, quasiment toutes les souches (excepté la 260) ont réussi à croître à 100 ppm. La 333 semble la plus tolérante (1.45 cm). Les souches 260, 322 et 333 ont supporté jusqu'à 500 ppm de cobalt. Cependant la 260 résiste mieux à cette concentration (0.6cm).

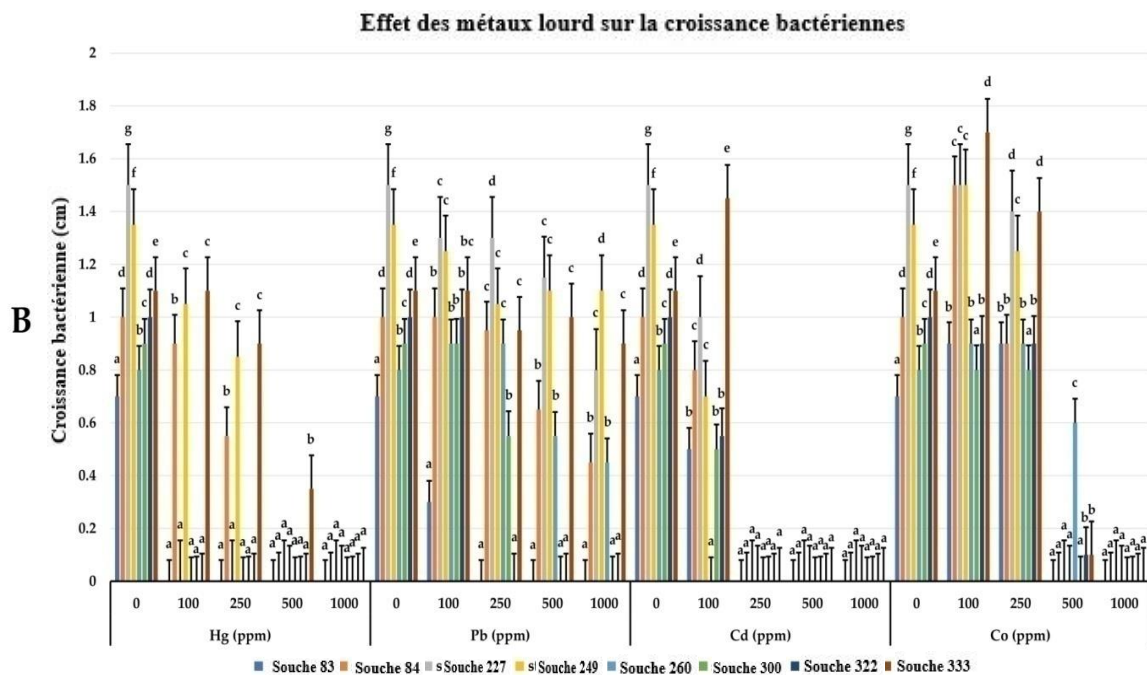


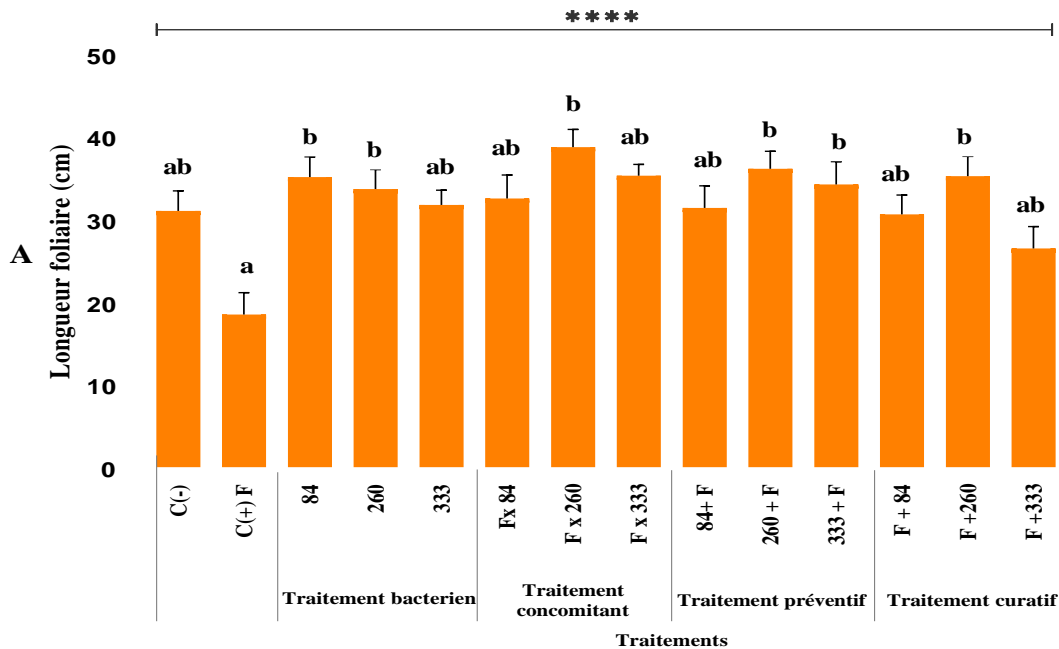
Fig. 25 : L'effet des différentes concentrations de métaux lourds (Hg, Pb, Cd, Co) sur la croissance des souches bactériennes. Les barres à moustaches = l'erreur standard. Les différentes lettres entre les barres de chaque groupe indiquent une différence significative à ($P < 0,05$) déterminées par ANOVA avec une comparaison de moyennes à l'aide de HSD de Tukey.

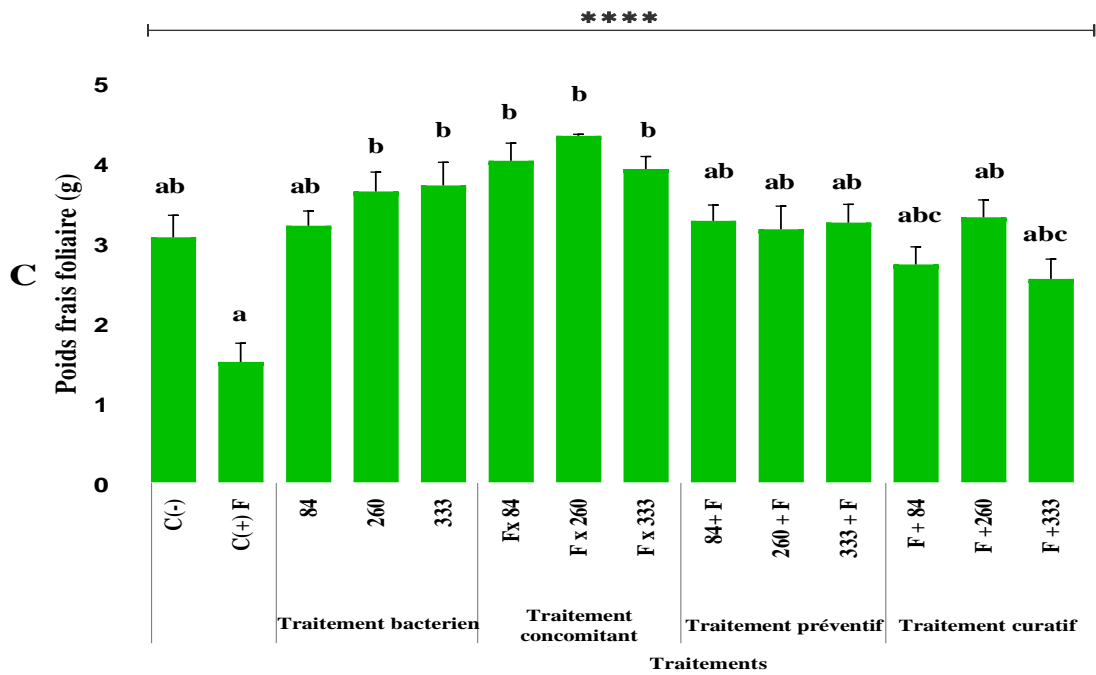
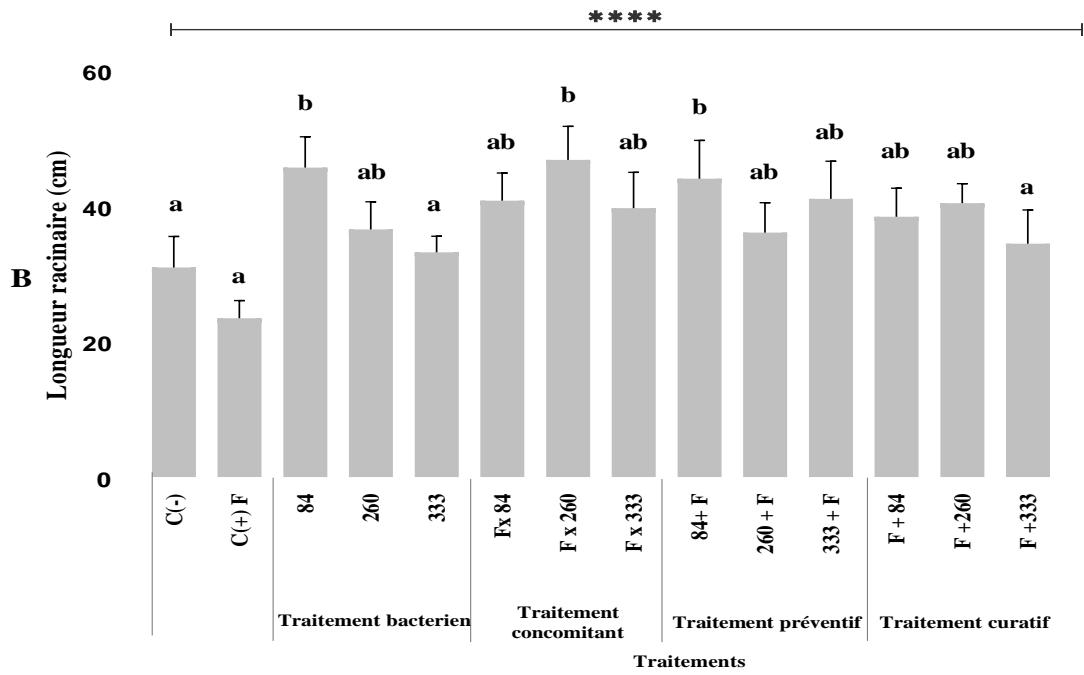
3-2- Effets de l'inoculation des souches bactériennes sur les paramètres morpho- biochimiques du palmier dattier sous stress biotique

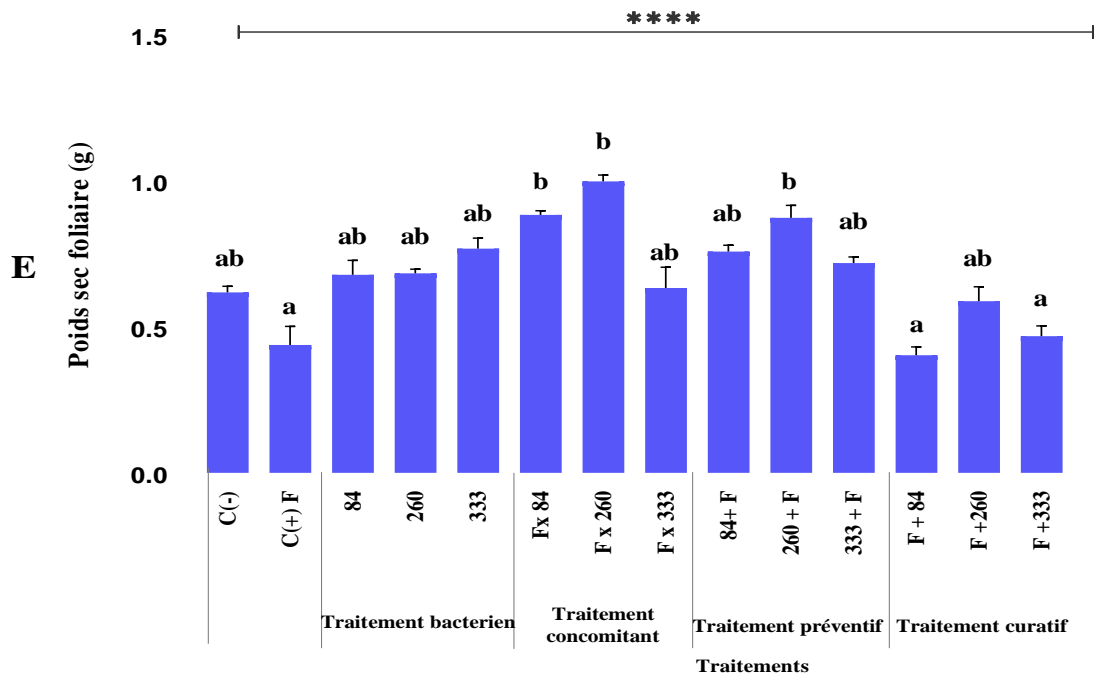
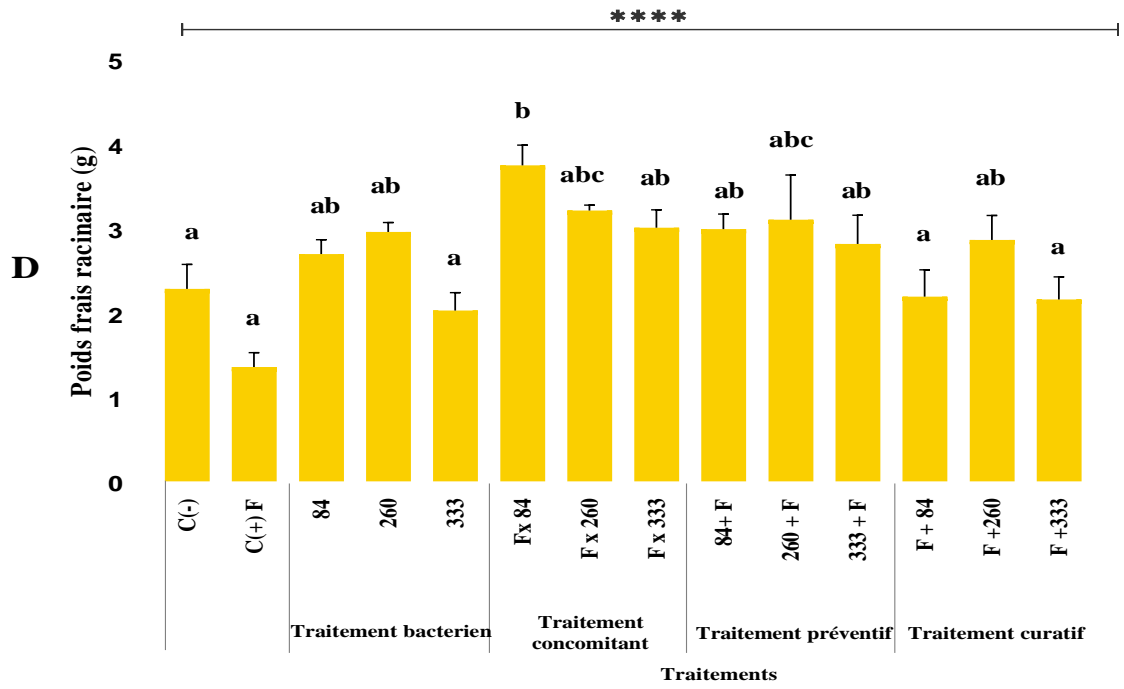
3-2-1- Sur sol stérile

3-2-1-1- Paramètres morphologiques

L'effet de l'inoculation par les trois souches bactériennes (84, 260, 333) sur le développement de la fusariose chez les plantes du palmier dattier cultivant sur support stérile est montré dans les Fig. 26,27. Les résultats de l'analyse de la croissance des plantes (taille, poids frais et sec des feuilles et des racines) sont comparés après 45 jours de traitement. Les symptômes de la maladie sont largement visibles sur les plantes infectées par le FOA et traduisent par une diminution significative de tous les paramètres de croissance des plantes. Cependant, l'application des souches bactériennes (84, 260, 333) seules ou dans les différents traitements, concomitant, préventif et curatif a conduit à une augmentation significative de la longueur des feuilles et des racines ainsi que de la biomasse foliaire et racinaire des plantes par rapport aux contrôles (Fig. 26 A, B, C, D et E). L'effet bénéfique de l'inoculation par les bactéries en tant qu'agent de biocontrôle et de biofertilisant est remarquable quel que soit le traitement.







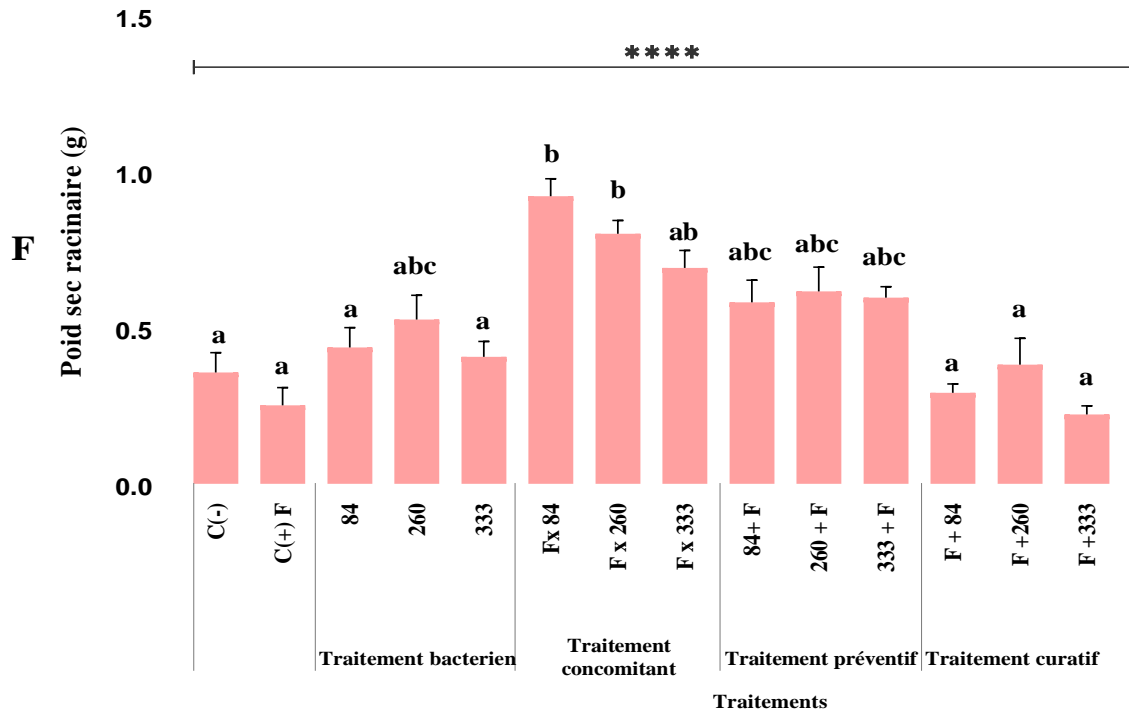


Fig. 26 : Effets des souches bactériennes sur (A,B) la longueur foliaire et racinaire (cm), (C,D) le poids frais des feuilles et des racines (g), et (E,F) le poids sec des feuilles et des racines (g) des plantes de palmier dattier avant et après infection par FOA cultivés en milieu stérile. Les barres à moustaches = erreur standard. Différentes lettres entre les barres de chaque groupe indiquent une différence significative à ($P < 0,05$) déterminée par ANOVA avec la comparaison des moyennes utilisant le HSD de Tukey.

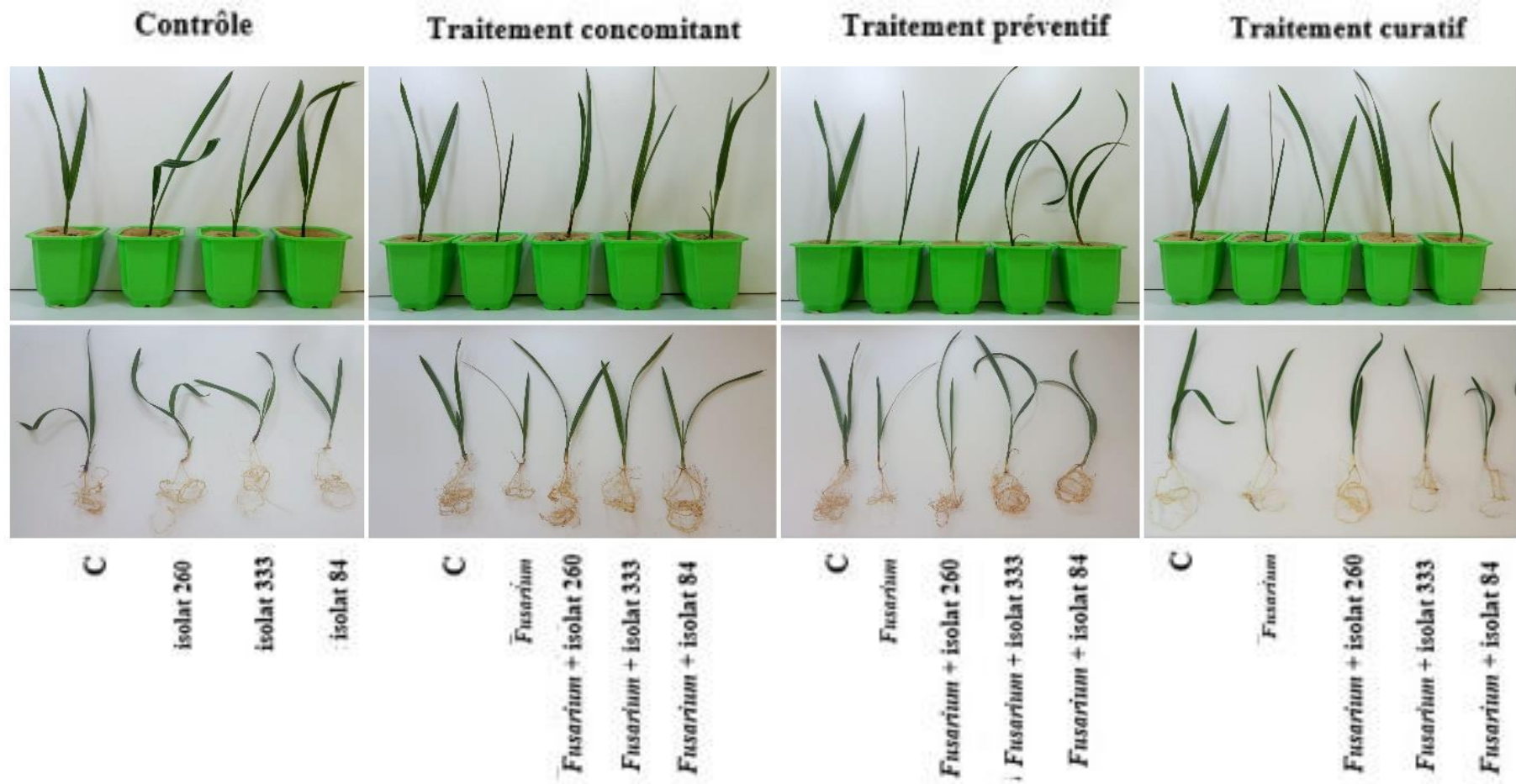


Fig. 27 : Effet de l'inoculation par les souches bactériennes sur les paramètres morphologiques du palmier dattier en présence et en absence du FOA cultivé en condition stérile.

3-2-1-2- Paramètres biochimiques

- Chlorophylle

Le contenu en chlorophylle des plantes du palmier dattier présente des valeurs significativement améliorées selon l'inoculum bactérien et la nature du traitement (Fig. 28). Les données ont révélé que l'infection par le FOA a influencé négativement les pigments photosynthétiques des plantes. Les différents traitements bactériens améliorent cette teneur en réduisant le stress biotique notamment dans les traitements concomitant et préventif. Les niveaux de chlorophylle A et totale sont améliorés dans les plantes inoculées par les trois bactéries ainsi que dans le traitement concomitant sauf pour la souche 333 qui montre une faible protection des plantes. Il convient de noter que le traitement préventif et curatif quoi qu'ils affichent des teneurs en chlorophylle plus faibles, leur effet bénéfique est visible comparativement aux plantes infectées. L'effet de l'inoculation sur la teneur en caroténoïdes est visible seulement chez les plantes non infectées et inoculées par les souches 260 et 333.

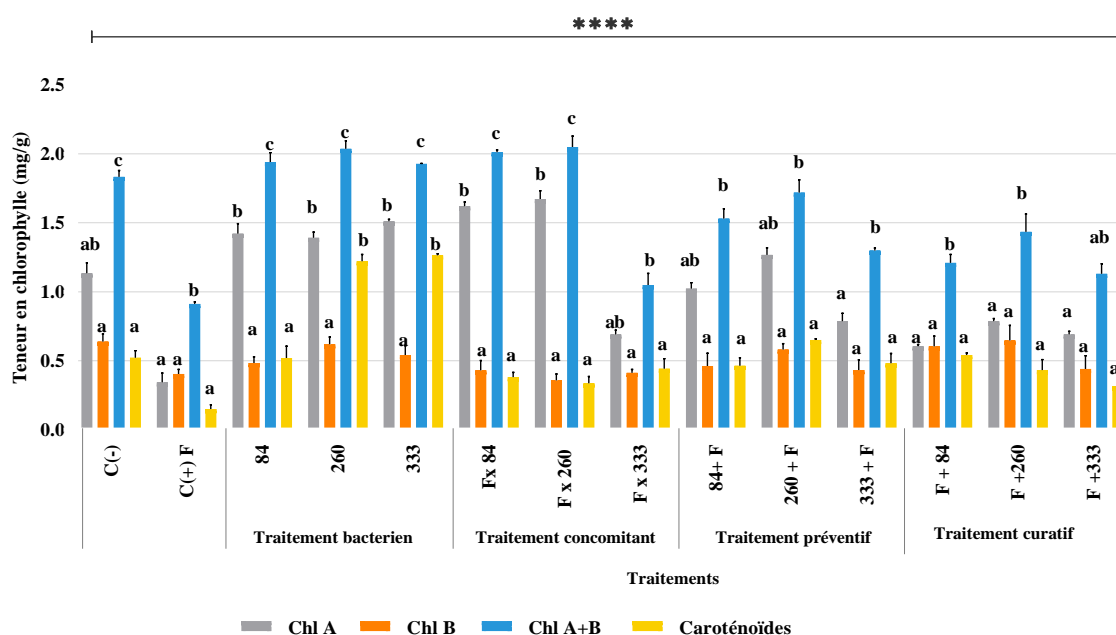
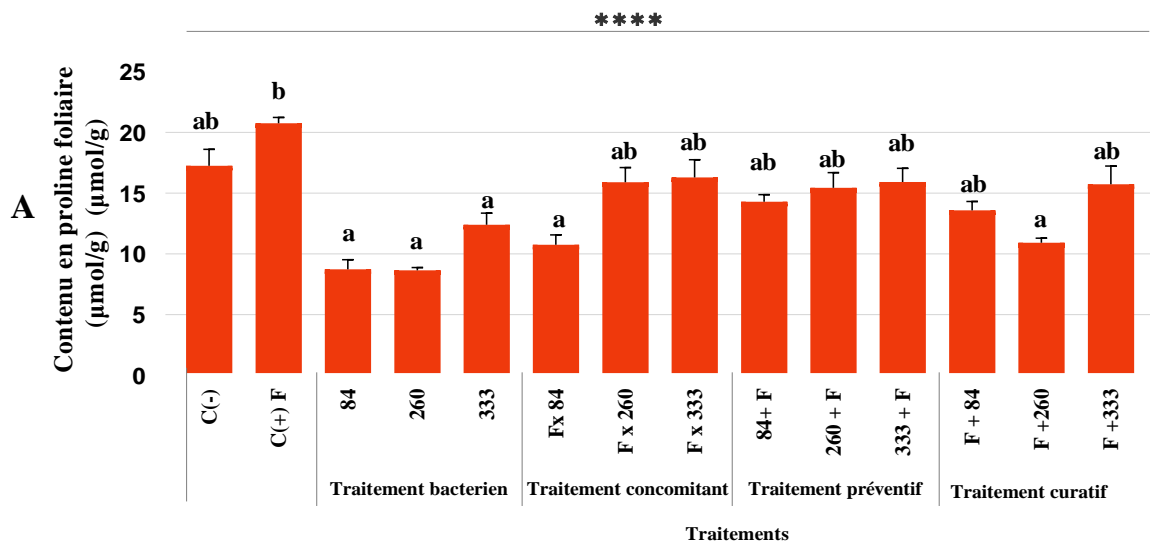


Fig. 28 : Effets des souches bactériennes sur la teneur en chlorophylle a, b, totale et en caroténoïdes (mg /g) des plantes de palmier dattier sous le stress du FOA. Les barres à moustaches = erreur standard. Différentes lettres entre les barres de chaque groupe

indiquent une différence significative à ($P < 0,05$) déterminée par ANOVA avec la comparaison des moyennes utilisant le HSD de Tukey.

- **Proline**

Les concentrations de proline foliaire et racinaire sont affectées par le stress engendré par le FOA (Fig. 29). Les concentrations sont fortement augmentées dans les feuilles et les racines des plantes infectées avec le FOA et ont atteint des niveaux de $20.75 \mu\text{mol/g}$ et $5.74 \mu\text{mol/g}$, respectivement. L'inoculation bactérienne entraîne une diminution de la teneur en proline foliaire et racinaire en absence du pathogène (plantes inoculées seulement). Une diminution significative du taux de proline racinaire et foliaire est remarquable dans les plantes inoculées en présence du FOA et dans les différents traitements concomitant et préventif et curatif par rapport au plantes infectées montrant une protection des souches bactériennes contre la fusariose.



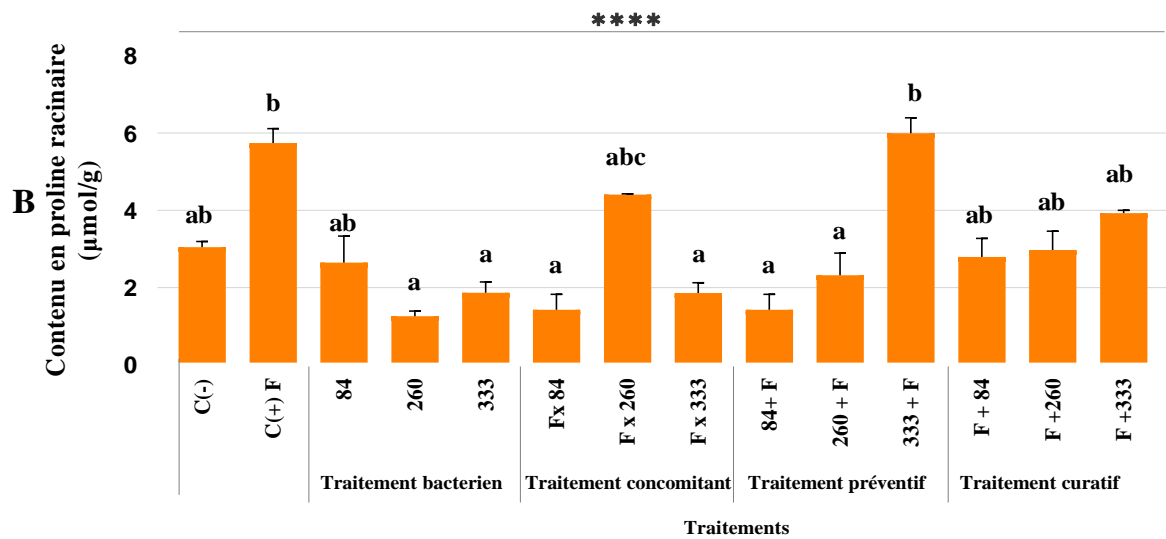


Fig. 29 : Effet de l'inoculation par les souches bactériennes sur (A) le contenu foliaire (B) et racinaire en proline ($\mu\text{mol/g}$) du palmier dattier avant et après exposition au stress du FOA. Les barres à moustaches = erreur standard. Différentes lettres entre les barres de chaque groupe indiquent une différence significative à ($P < 0,05$) déterminée par ANOVA avec la comparaison des moyennes utilisant le HSD de Tukey.

- Sucres totaux

Une variation significative est observée dans la teneur en sucre des feuilles et des racines des plantes (Fig. 30). La teneur en sucre est augmentée dans les feuilles et les racines des plantes infectées avec le FOA. Une diminution significative de la concentration des sucres foliaires et racinaires est constatée dans les plantes inoculées et infectées avec le FOA dans les trois traitements.

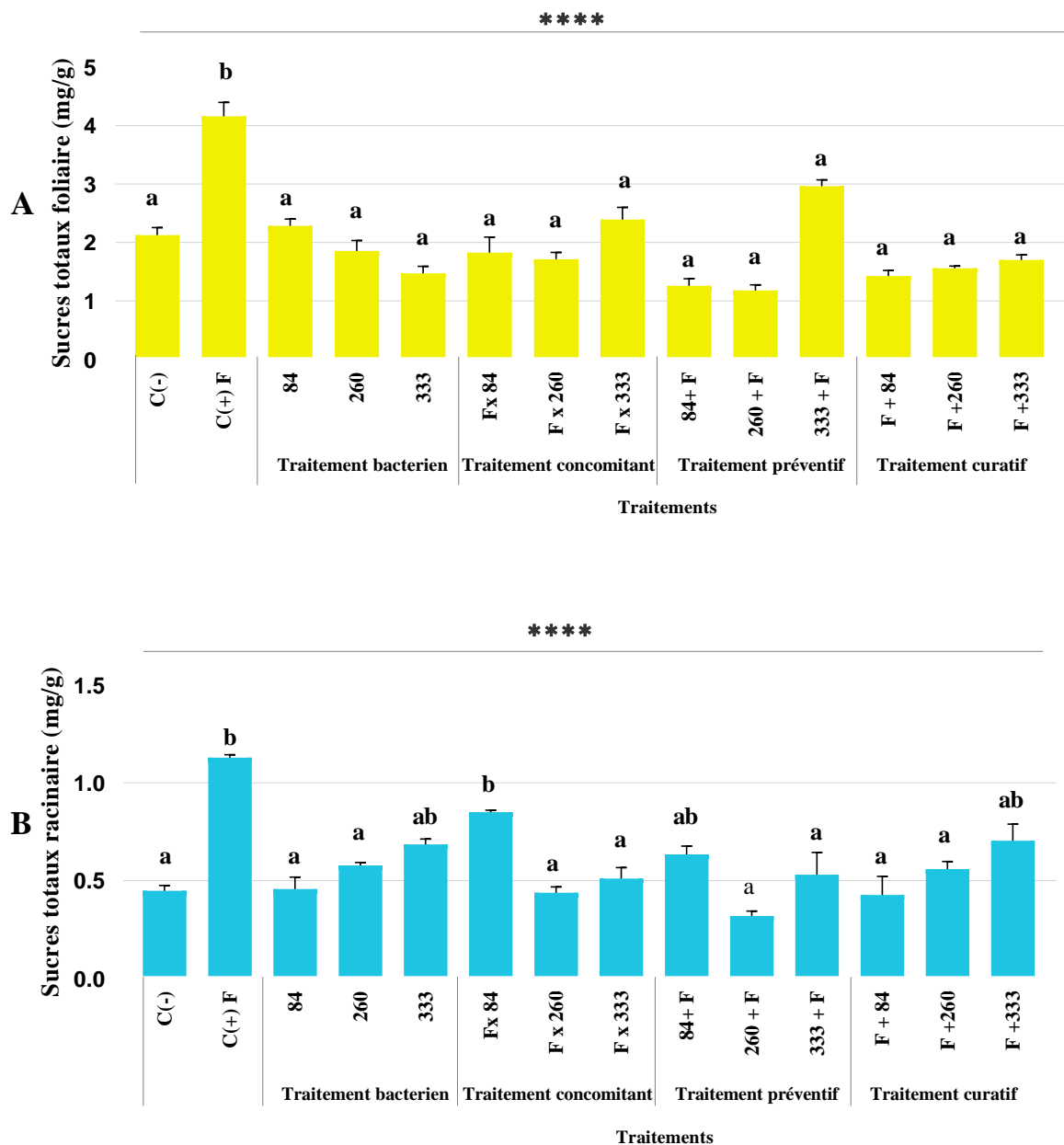


Fig. 30: Effet de l'inoculation par les souches bactériennes sur (A) le contenu foliaire (B) et racinaire des sucres totaux (mg/g) du palmier dattier avant et après exposition au stress du FOA. Les barres à moustaches = erreur standard. Différentes lettres entre les barres de chaque groupe indiquent une différence significative à ($P < 0,05$) déterminée par ANOVA avec la comparaison des moyennes utilisant le HSD de Tukey.

- **Malondialdéhyde (MDA)**

Comme illustré sur la Fig. 31, les conditions de stress ont conduit à l'augmentation de la production de MDA dans les plantes du palmier dattier. Les résultats montrent que l'inoculation des plantes avec les bactéries a réduit significativement ($p < 0.05$) les teneurs

en MDA. Il est à noter que les niveaux de MDA foliaire et racinaire sont diminués dans les plantes après les traitements concomitant et préventif par rapport au traitement curatif qui affiche un taux foliaire plus élevé.

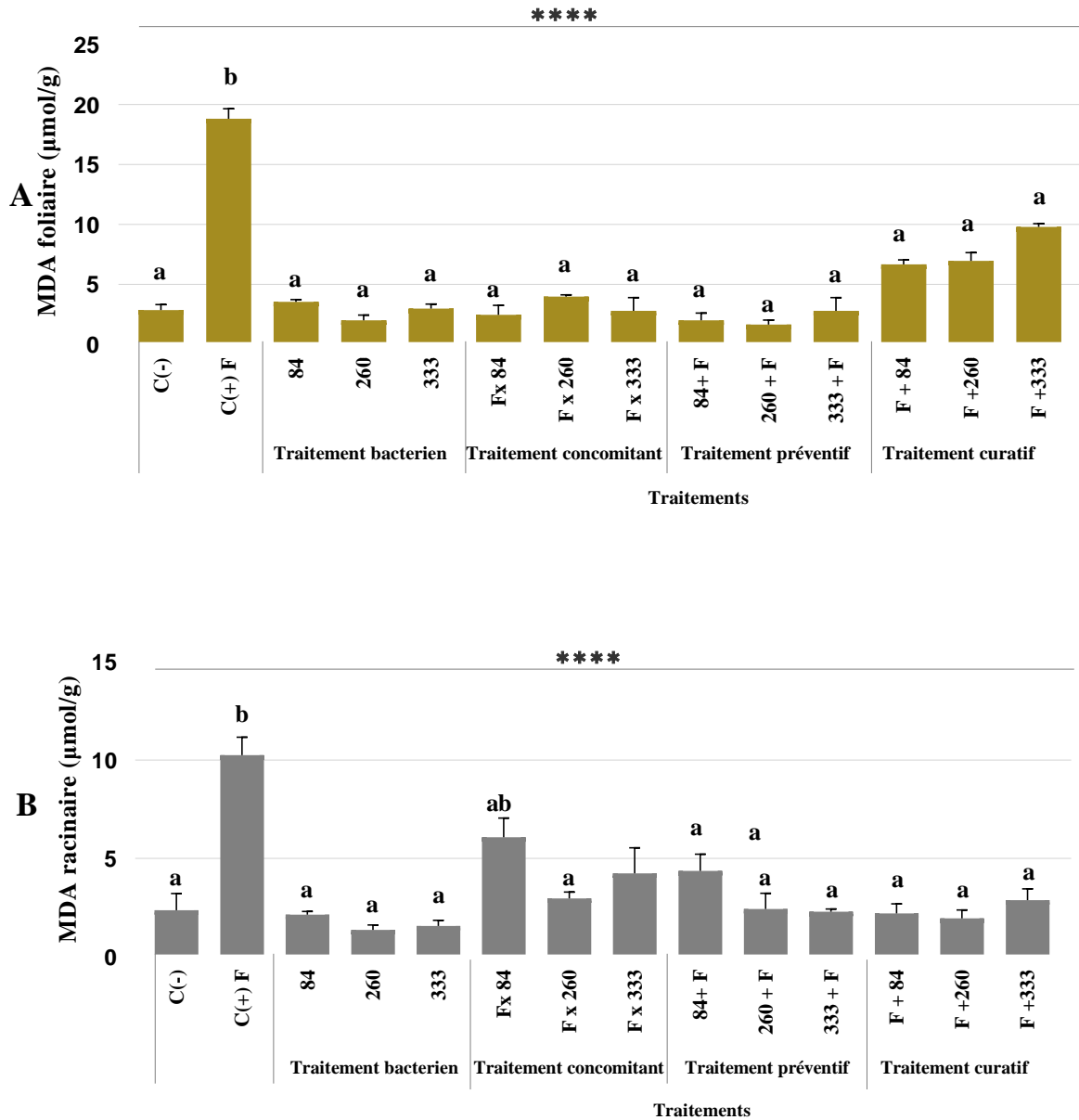
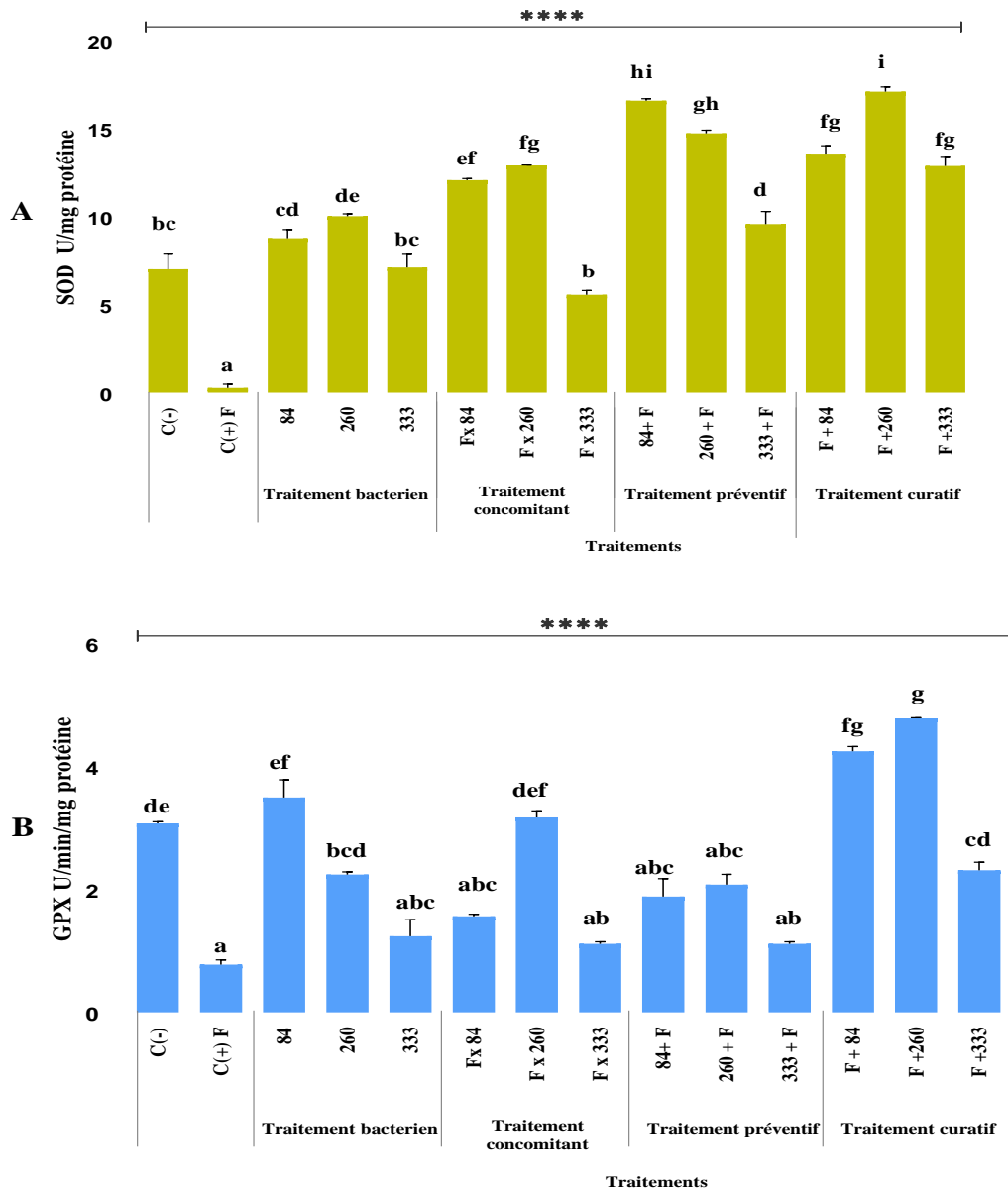


Fig. 31 : Effet de l'inoculation par les souches bactériennes sur (A) la concentration foliaire (B) et racinaire de MDA (µmol/g) du palmier dattier avant et après exposition au stress du FOA. Les barres à moustaches = erreur standard. Différentes lettres entre les barres de chaque groupe indiquent une différence significative à (P < 0,05) déterminée par ANOVA avec la comparaison des moyennes utilisant le HSD de Tukey.

3-2-1-3- Détermination de l'activité des enzymes antioxydantes

L'effet des souches bactériennes sur l'activité des enzymes antioxydantes des feuilles des plantes du palmier dattier en présence et en absence du FOA est enregistré dans la Fig. 32. Les plantes infectées par le FOA montrent une réduction considérable de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, GPX, APX, CAT). Cependant, ces enzymes sont significativement ($p < 0.05$) améliorées dans les plantes inoculées et stressées par le pathogène indépendamment de la nature du traitement.



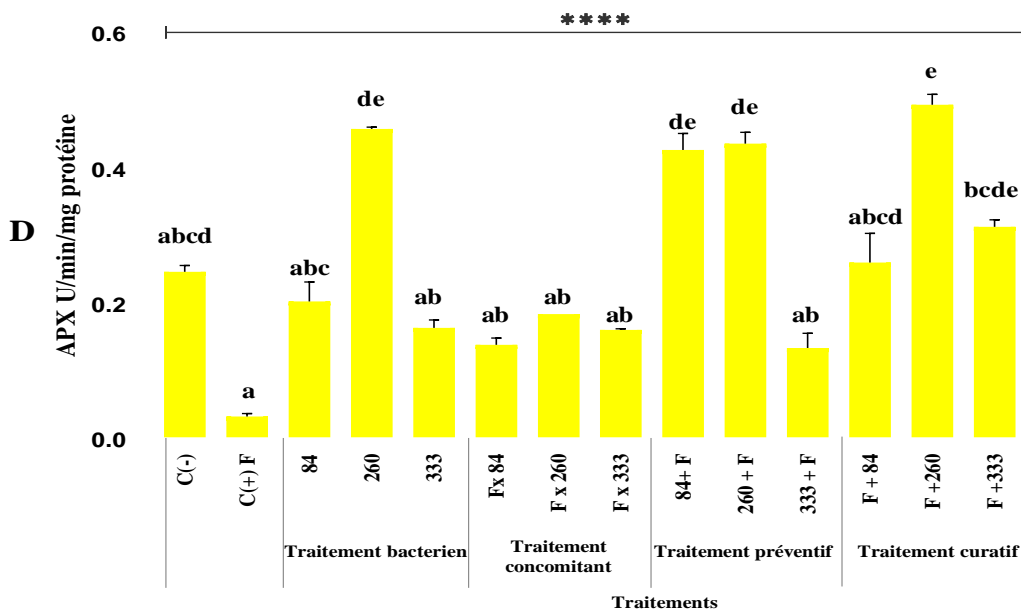
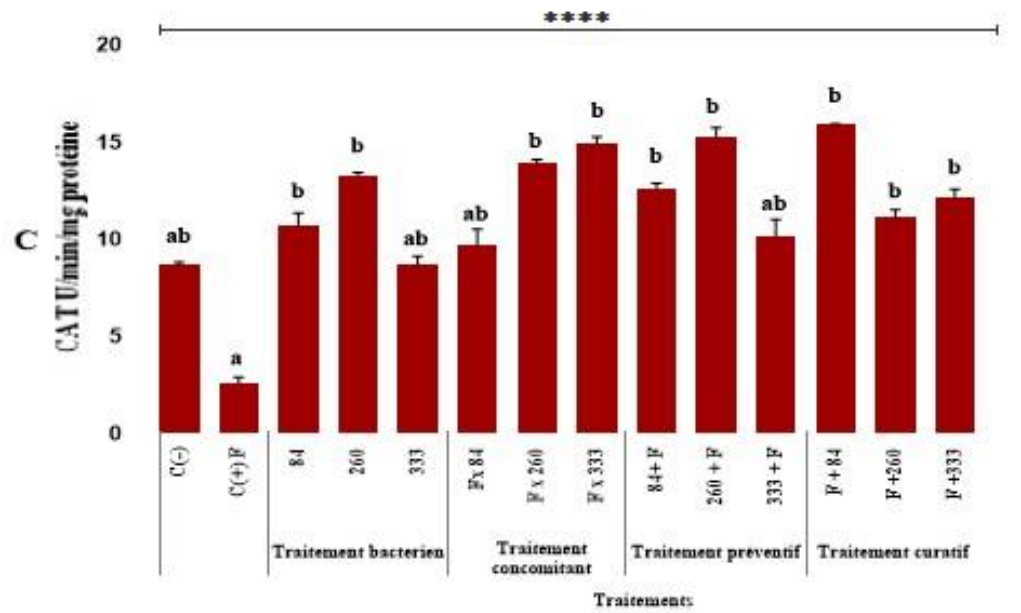
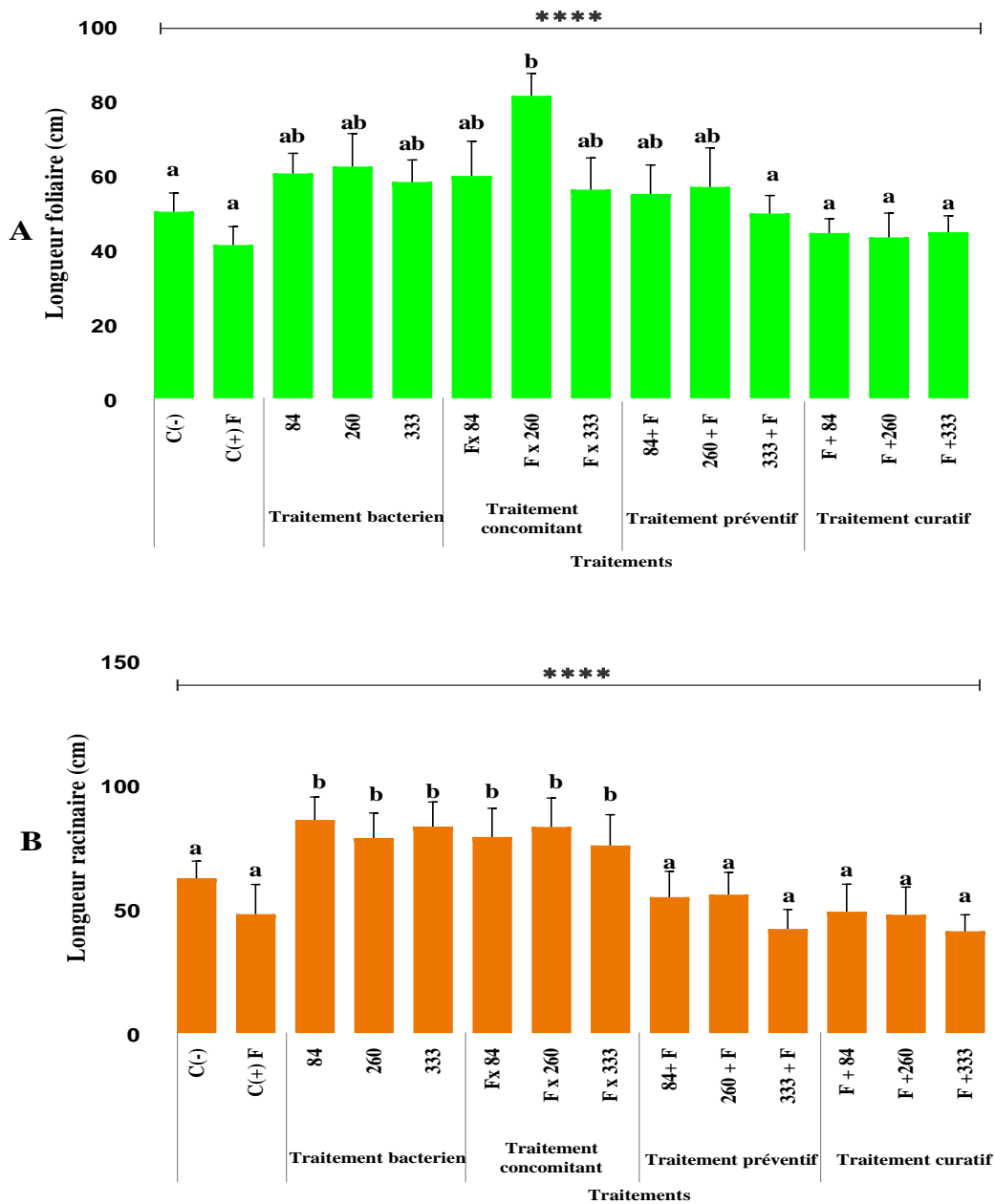


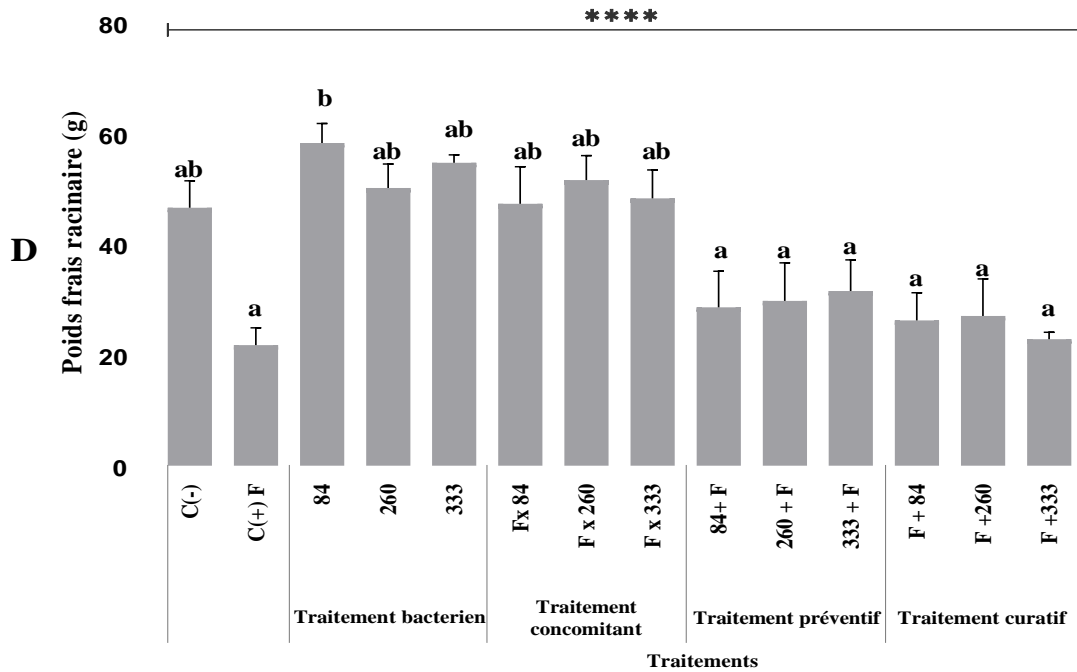
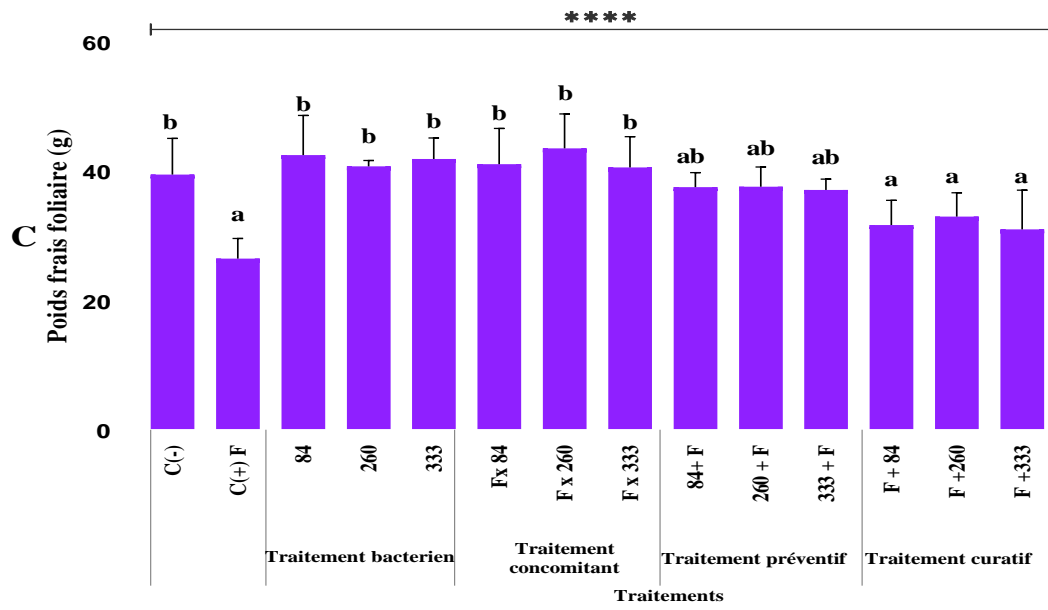
Fig. 32 : Effet des souches bactérienne sur la teneur en (A) superoxyde dismutase (SOD) ($\mu\text{mole}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine), (B) gaïacol peroxydase (GPX) ($\mu\text{mole}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine), (C), Catalase ($\mu\text{mole}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine) et ascorbate peroxydase (APX) ($\mu\text{mole}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine) des feuilles de palmier dattier exposées aux stress du FOA. Les barres à moustaches = erreur standard. Différentes lettres entre les barres de chaque groupe indiquent une différence significative à ($P < 0,05$) déterminée par ANOVA avec la comparaison des moyennes utilisant le HSD de Tukey.

3-2-2 Sur sol non stérile

3-2-2-1- Paramètres morphologiques

L'effet de l'inoculation des plantes par les souches de *Bacillus* (84, 260, 333) sur les paramètres morphologiques du palmier dattier sous stress biotique est révélé dans la Fig. 33 et 34. Le stress engendre un effet négatif sur la croissance des plantes. L'analyse des résultats révèle une augmentation de l'allongement foliaire et racinaire de la plante ainsi que du poids frais et sec (Fig. 33 A, B, C, D, E et F) chez les plantes inoculées et infectées.





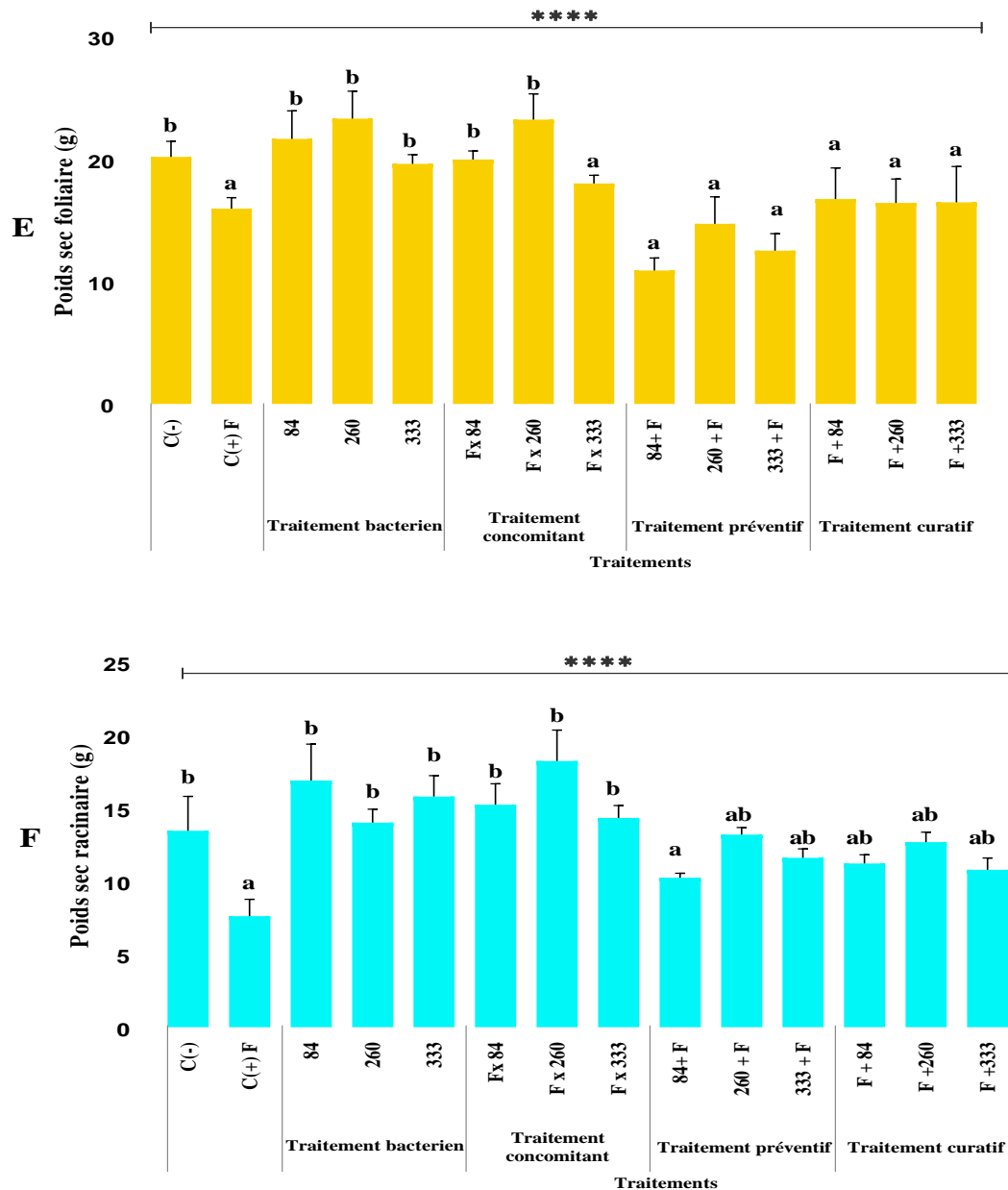


Fig. 33 : Effet des souches bactériennes sur (A,B) la longueur foliaire et racinaire (cm), (C,D) le poids frais des feuilles et des racines (g), et (E,F) le poids sec des feuilles et des racines (g) des plantes de palmier dattier avant et après infection par FOA cultivés en milieu non stérile. Les barres à moustaches = erreur standard. Différentes lettres entre les barres de chaque groupe indiquent une différence significative à ($P < 0,05$) déterminée par ANOVA avec la comparaison des moyennes utilisant le HSD de Tukey.

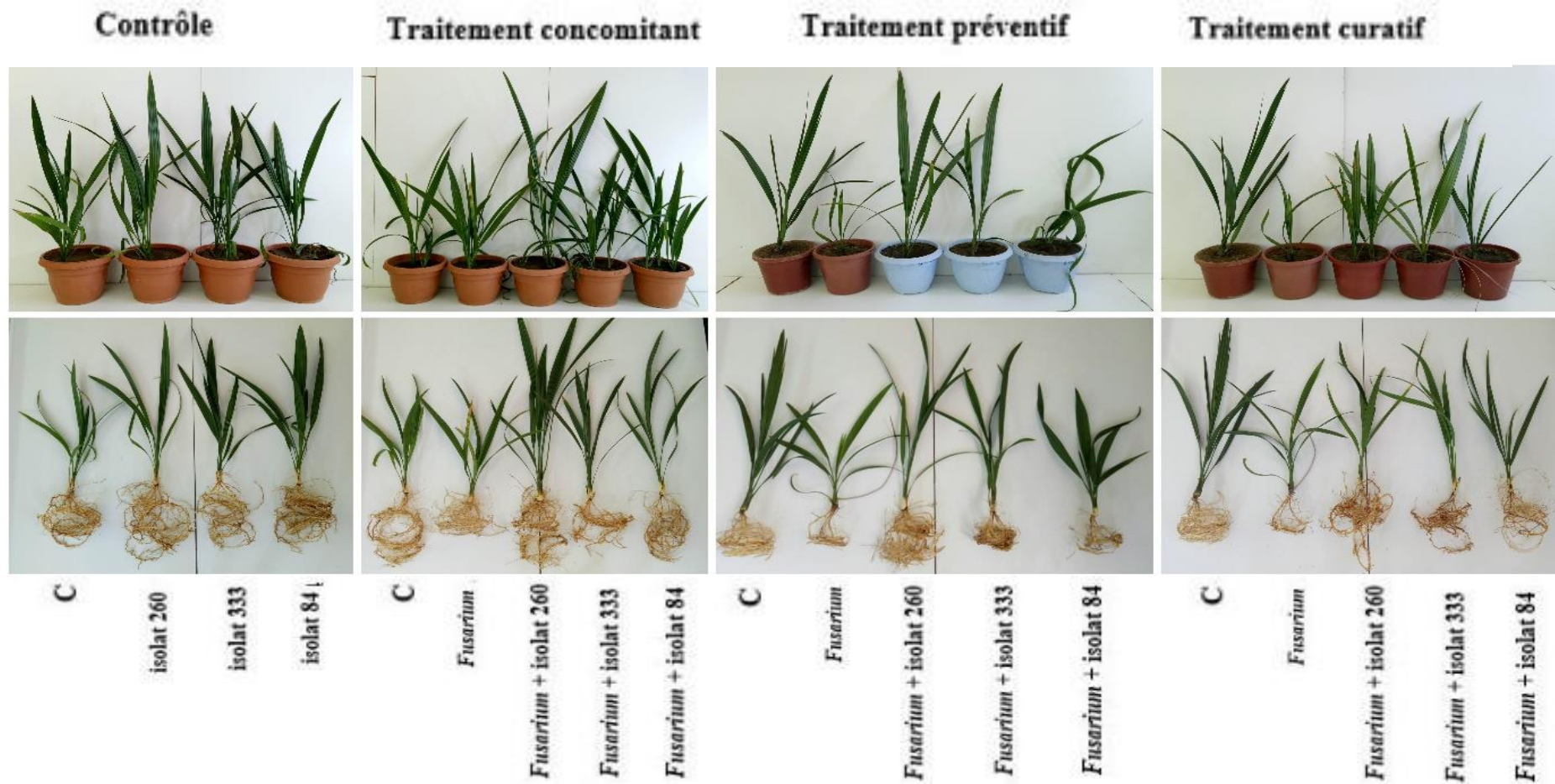


Fig. 34 : Effet de l'inoculation par les souches bactériennes sur les paramètres morphologiques du palmier dattier en présence et en absence du FOA cultivé en condition non stérile

3-2-2-2- Paramètres biochimiques

- Chlorophylle

Le stress du FOA entraîne des réductions notoires des teneurs en chlorophylle a, b, totale et en caroténoïde (Fig.35). Cependant, l'inoculation améliore significativement la teneur de ces pigments chez les plantes infectées et inoculées infectées ou non.

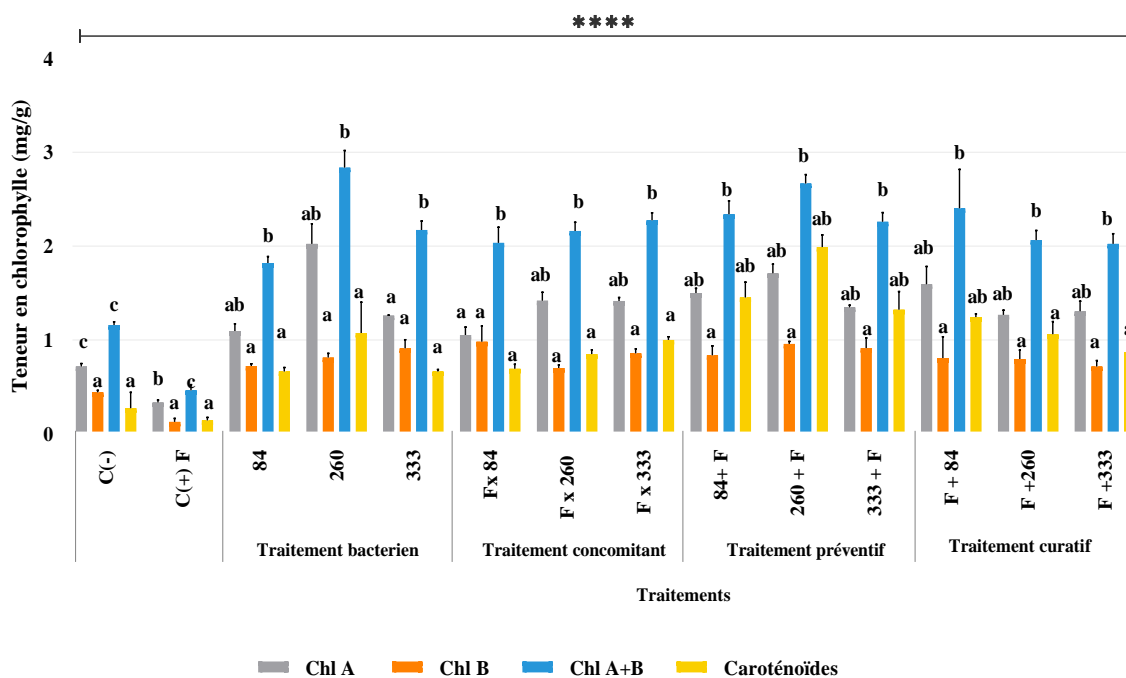


Fig. 35 : Effet des souches bactériennes sur la teneur en chlorophylle a, b, totale et en caroténoïdes (mg /g) des plantes du palmier dattier sous le stress du FOA. Les barres à moustaches = erreur standard. Différentes lettres entre les barres de chaque groupe indiquent une différence significative à (P < 0,05) déterminée par ANOVA avec la comparaison des moyennes utilisant le HSD de Tukey.

- Proline

Les concentrations de proline foliaire et racinaire sont augmentées suite à l'infection des plantes par le FOA (Fig. 36). Les teneurs en proline ont été fortement augmentées dans les feuilles et les racines des plantes infectées avec le FOA. Cependant, l'effet des différents traitements révèle des réductions appréciables des contenus en proline au niveau des racines et des feuilles.

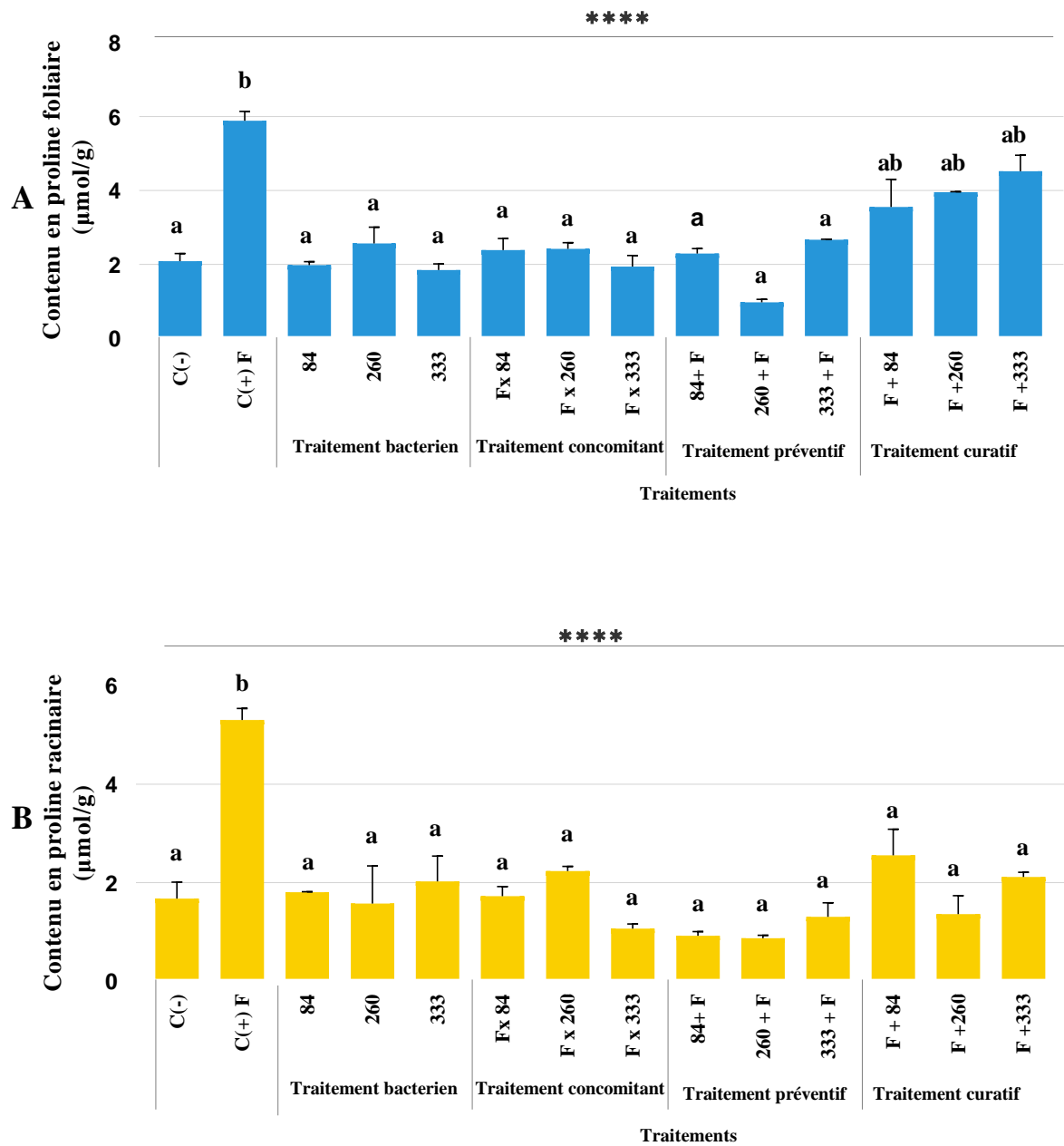


Fig. 36 : Effet de l'inoculation par les souches bactériennes sur (A) le contenu foliaire (B) et racinaire en proline (µmol/g) du palmier dattier avant et après exposition au stress du FOA. Les barres à moustaches = erreur standard. Différentes lettres entre les barres de chaque groupe indiquent une différence significative à (P < 0,05) déterminée par ANOVA avec la comparaison des moyennes utilisant le HSD de Tukey.

- Sucres totaux

L'augmentation notable des teneurs en sucres totaux foliaires et racinaires est révélatrice d'un stress végétal subi suite à l'infection par le FOA. Cependant, l'inoculation bactérienne permet une diminution significative de ces teneurs essentiellement au niveau des feuilles pour tous les traitements (Fig. 37).

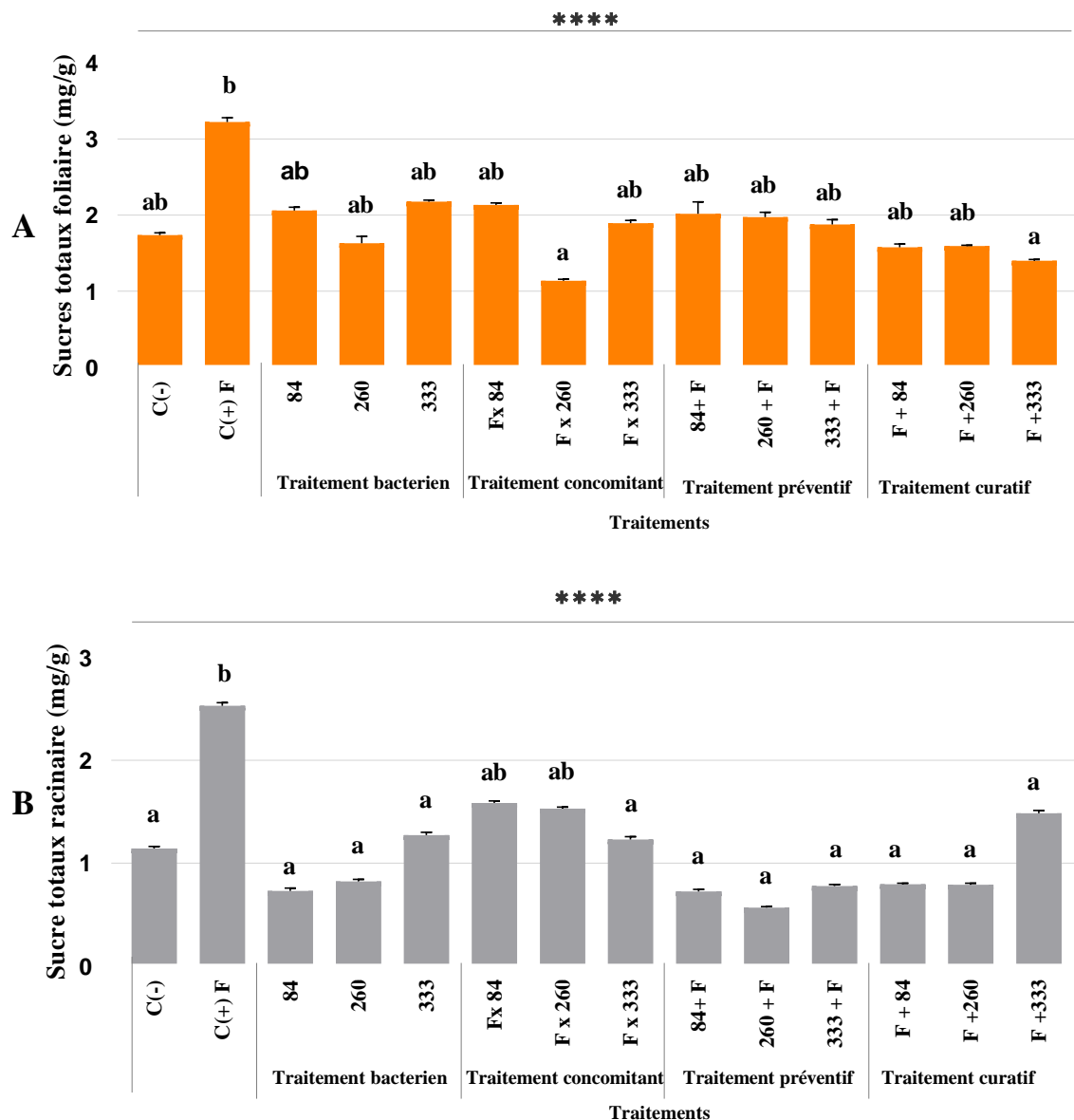


Fig. 37 : Effet de l'inoculation par les souches bactériennes sur (A) le contenu foliaire (B) et racinaire des sucres totaux (mg/g) du palmier dattier avant et après exposition au stress du FOA. Les barres à moustaches = erreur standard. Différentes lettres entre les barres de chaque groupe indiquent une différence significative à (P < 0,05) déterminée par ANOVA avec la comparaison des moyennes utilisant le HSD de Tukey.

- **Malondialdehyde (MDA)**

Dans les plantes infectées non traitées, le FOA provoque une augmentation de MDA (Fig.38). Toutefois, suite à l'inoculation bactérienne par les trois souches une réduction drastique de cette enzyme est constatée dans les différents traitements.

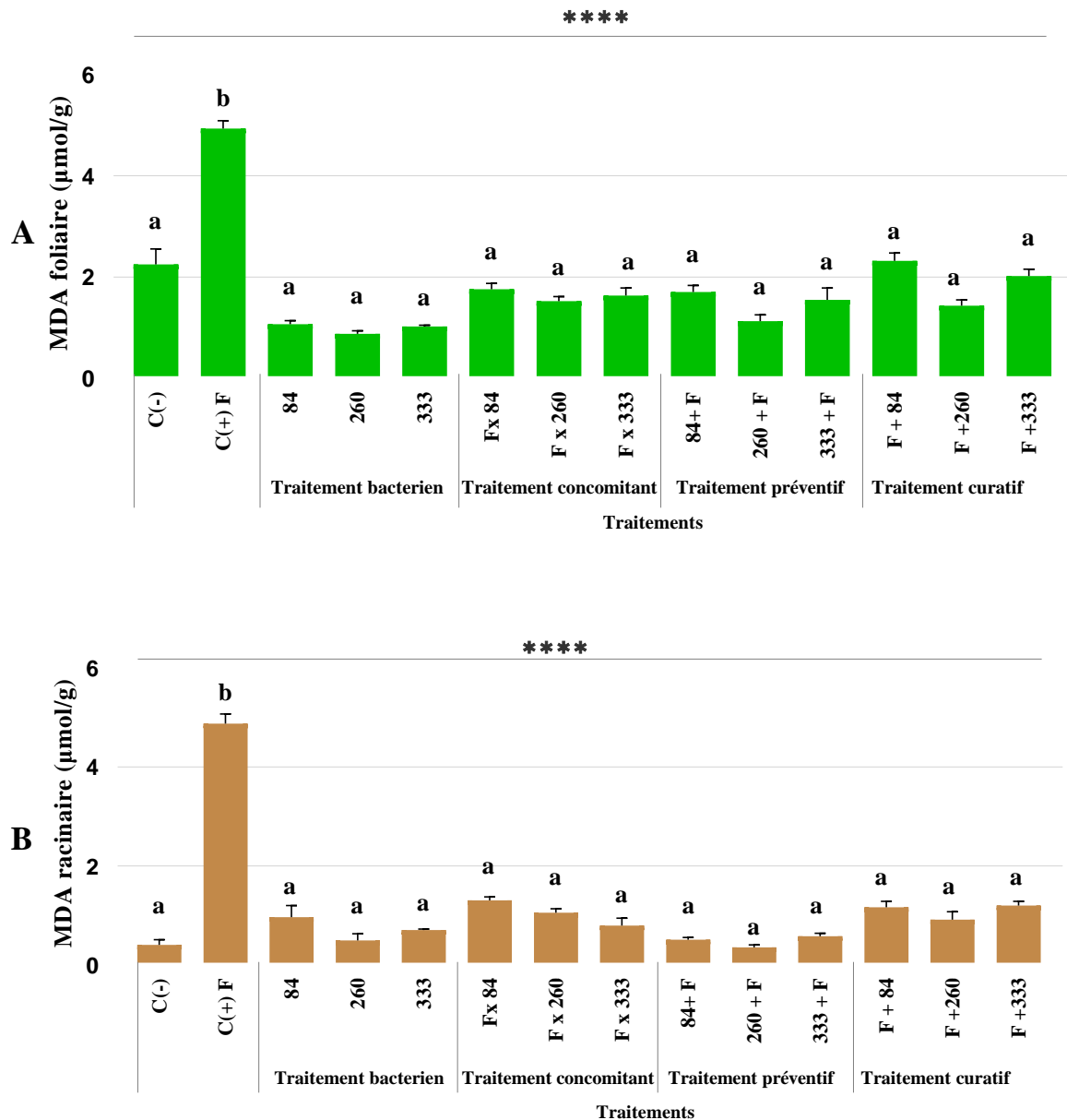
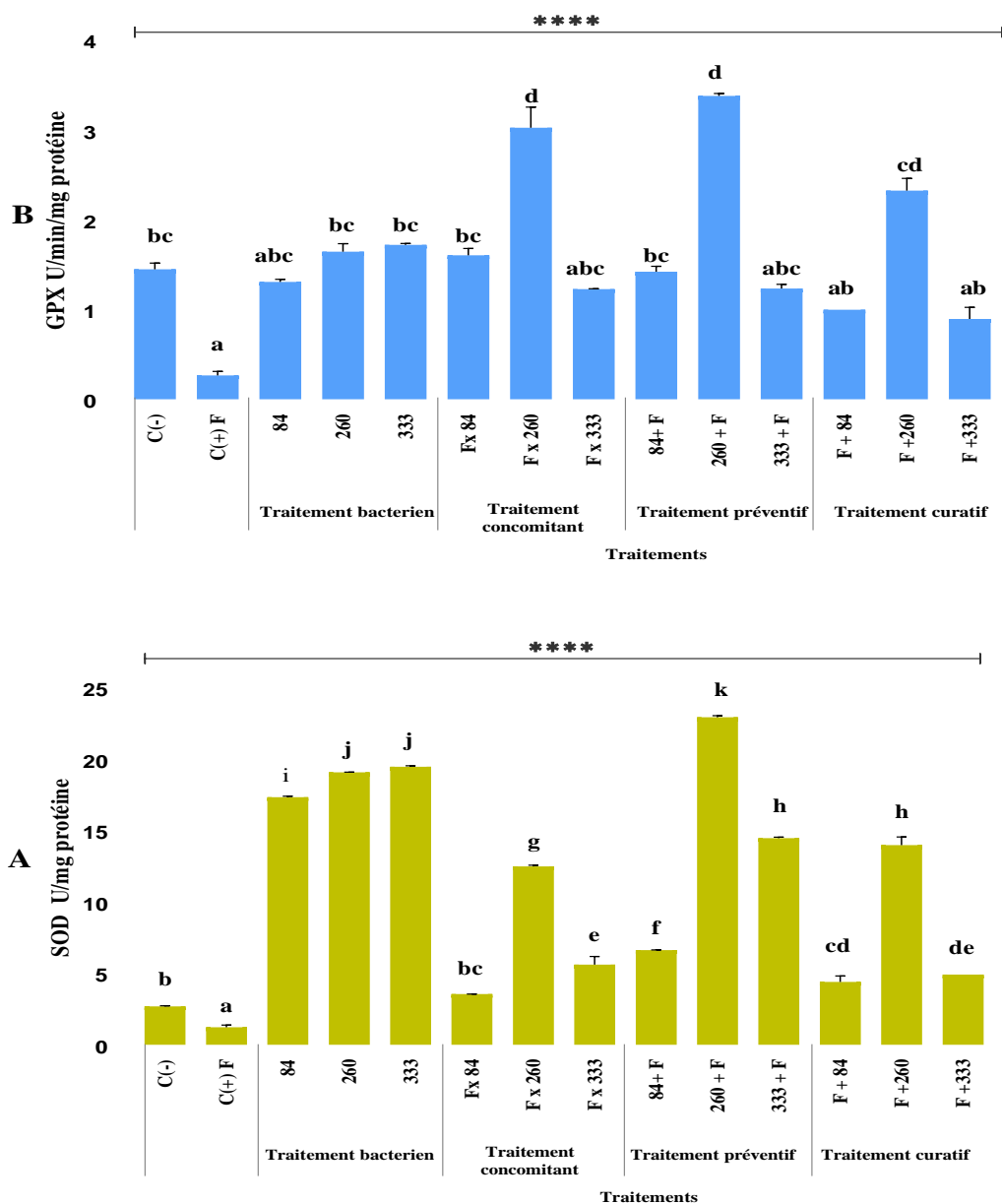


Fig. 38 : Effet de l'inoculation par les souches bactériennes sur (A) la concentration foliaire (B) et racinaire de MDA (µmol/g) du palmier dattier avant et après exposition au stress du FOA. Les barres à moustaches = erreur standard. Différentes lettres entre les barres de chaque groupe indiquent une différence significative à (P < 0,05) déterminée par ANOVA avec la comparaison des moyennes utilisant le HSD de Tukey.

3-2-2-3- Détermination de l'activité des enzymes antioxydantes

L'effet de l'inoculation bactérienne des souches bactériennes sur l'activité des enzymes antioxydantes des feuilles des plantes de palmier dattier en présence et en absence du FOA est montré dans la Fig. 39. Les plantes infectées par le FOA montrent une réduction significative de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, GPX, APX, CAT). En présence des inoculants bactériens, une stimulation de l'activité de ces enzymes est constatée dans les trois traitements essentiellement avec la souche 260 où on note des augmentations considérables des activités de la SOD, GPX, APX et catalase dans les traitements concomitant, préventif et curatif.



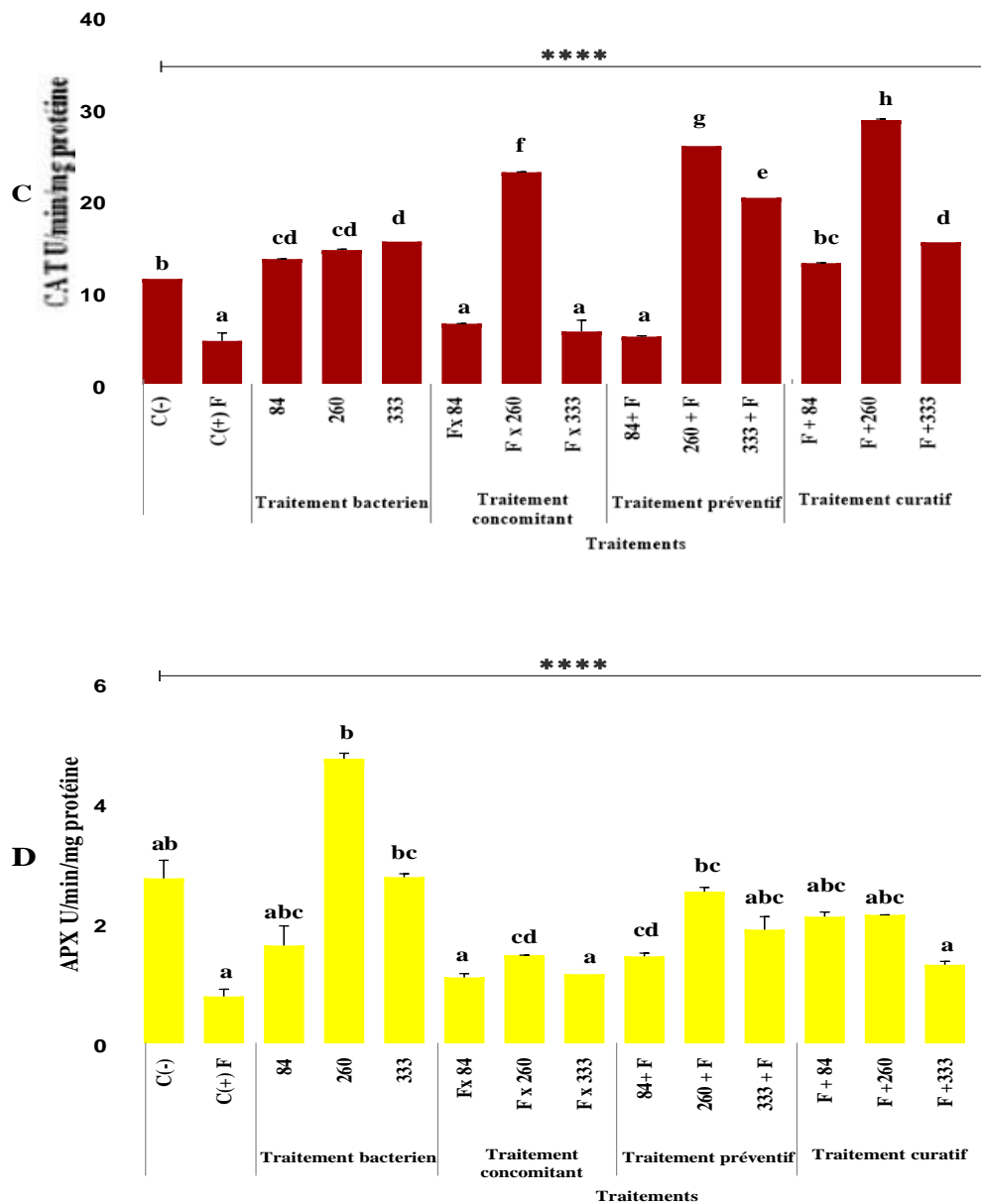


Fig. 39 : Effet des souches bactérienne sur la teneur en (A) superoxyde dismutase (SOD) ($\mu\text{mole}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine), (B) gaïacol peroxydase (GPX) ($\mu\text{mole}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine), (C), catalase ($\mu\text{mole}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine) et ascorbate peroxydase (APX) ($\mu\text{mole}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine) des feuilles de palmier dattier exposées aux stress du FOA. Les barres à moustaches = erreur standard. Différentes lettres entre les barres de chaque groupe indiquent une différence significative à ($P < 0,05$) déterminée par ANOVA avec la comparaison des moyennes utilisant le HSD de Tukey.

4- Discussion

Le flétrissement vasculaire du palmier dattier également connue sous le nom de Bayoud, causé par FOA est la maladie la plus destructrice en Afrique du Nord, n'ayant pas de stratégie de contrôle efficace (Mouloud *et al.*, 2017). Depuis son apparition, cette maladie a entraîné d'énormes pertes économiques dues à la baisse du rendement et de la qualité des cultures (Abouamama *et al.*, 2018). Compte tenu des inconvénients de la lutte chimique, la lutte biologique reste le moyen le plus efficace. L'utilisation de micro-organismes est l'une des méthodes de lutte biologique les plus prometteuses pour supprimer les maladies des plantes. Dans tout écosystème l'interaction hôte microbiote est un concept établi. Cette relation de symbiose microbienne joue un rôle important dans le contrôle de la croissance des plantes et dans la résistance aux maladies. Par conséquent, l'étude de la microflore associée au palmier dattier est nécessaire pour identifier les agents bénéfiques importants dans la prévention des infections par des pathogènes et contribuant, ainsi, à la croissance des cultivars de palmier dattier de haute qualité exempts de maladies. La recherche sur le sol environnant est importante car les maladies peuvent être contrôlées par des micro-organismes antagonistes habitant le sol (Nishad et Ahmed, 2020). De nombreuses souches de PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) sont responsable de la suppression de divers agents phytopathogènes en produisant des métabolites antagonistes et en améliorant le potentiel immunitaire des cultures contre le stress des pathogènes (Majeed *et al.*, 2018). Cette étude vise à cribler les espèces bactériennes antagonistes du FOA. Ainsi, l'exploration des foyers épidémiques dans les palmeraies de la vallée du M'zab étant le front de progression du Bayoud depuis plus de 40 ans constitue les sites d'échantillonnage. Deux sites sont choisis El-Atteuf et Metlili pour l'isolement de souches bactériennes issues de sols rhizosphériques sains et infectés, de sols non rhizosphériques (entre palmiers) et de racines de palmiers sains et infectés. Un nombre important de bactéries sont liées à la rhizosphère représentant le principal lieu d'absorption des nutriments (Hashem *et al.*, 2019). Dans cet environnement, les racines des plantes fournissent aux micro-organismes du sol des exsudats racinaires qui sont utilisés comme substrats et molécules de signalisation. Ces molécules interviennent dans les interactions entre les racines des plantes et les communautés microbiennes de la rhizosphère (Huang *et al.*, 2014). Les isolats (n = 335) récupérés sur ces deux sites sont criblés pour leur effet inhibiteur contre le FOA à l'aide de tests de confrontation *in vitro*, par la méthode de la double culture. Les taux d'isolats actifs sont de 19,84%, 26,37%, 17,74%, 27,27% et 26,08% provenant

respectivement de sols rhizosphériques sains, de sols infectés, non rhizosphériques et de racines saines et infectées. Ces niveaux indiquent que le nombre de bactéries endophytes et rhizosphériques antagonistes est supérieur à celui des bactéries non rhizosphériques. Cela peut s'expliquer par le fait que la surface et le système racinaire sont colonisés par un large éventail de bactéries capables de stimuler la croissance et la santé des plantes (Djaya *et al.*, 2019). Certaines bactéries endophytes colonisant une niche écologique les rendent adaptées comme agents de lutte biologique (Vinayarani et Prakash, 2018). Les agents de lutte biologique peuvent avoir de meilleures chances de s'établir et de contrôler efficacement les agents pathogènes s'ils proviennent du sol par rapport aux micro-organismes exotiques. Car ce type de micro-organismes indigènes sont déjà adaptés au climat et aux conditions édaphiques locales ainsi qu'au microbiote du sol (Khalil *et al.*, 2021). Il a été décrit que les endophytes des palmiers dattiers malades représentent une niche intéressante d'endophytes capables de contrôler un large éventail de pathogènes végétaux (Cheffi *et al.*, 2019).

Dans notre étude, nous avons sélectionné huit souches bactériennes plus performantes présentant de forte activité antifongique envers FOA. Ces souches sont testées contre différentes souches de FOA et d'autres champignons phytopathogènes. Les résultats ont montré que toutes les souches bactériennes ont une action inhibitrice vis-à-vis des champignons testés. Un taux d'inhibition maximal de 52.94% est observé chez la souche 333 envers FOA 5. La souche 84 est plus efficace pour inhiber la croissance des souches de FOA1, FOA2 et FOA4, respectivement, avec des inhibitions de 48.61%, 46.88% et 42.85%. FOA3 est plus sensible à l'action antagoniste exercé par la souche 333 (48.22%). Des résultats similaires sont observés par Slama *et al.* (2019) où ils ont criblé quatre isolats bactériens désignés BFOA1, BFOA2, BFOA3 et BFOA4, qui se sont révélés très actifs contre FOA LMA1. Ces bactéries se sont avérées efficaces pour inhiber d'autres souches de FOA à savoir les souches LMA2-LMA5. Le pourcentage d'inhibition de FOA est environ de 55%. D'autres auteurs ont prouvé ainsi l'efficacité antifongique des deux souches *B. amyloliquefaciens* Ag1 et *Burkholderia cepacia* Cs5 contre FOA avec des taux d'inhibition maximum de 75% et 83% respectivement (Dihazi *et al.*, 2012). Il est prouvé que certains microorganismes comme *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp, actinomycètes spp, et *Aspergillus* spp isolées du sol entourant les racines du palmier dattier se sont avérées antagonistes envers FOA offrant ainsi une protection aux palmiers dattiers contre la maladie du Bayoud (Nishad et Ahmed, 2020).

De plus, les isolats bactériens ont montré une activité inhibitrice contre quatre autres pathogènes végétaux majeurs (Aa, Fg, Fs et Pi) infectant également d'autres cultures plantées dans les mêmes écosystèmes oasiens exploités dans cette étude. En raison de leur potentiel de biocontrôle, ces souches peuvent être utilisées comme agents de lutte biologique contre de nombreux phytopathogènes (Pellegrini *et al.*, 2020).

L'identification phylogénétique des souches bactériennes par le séquençage de l'ARN 16S révèle que toutes les souches appartiennent phylogénétiquement aux espèces de *Bacillus* (*B. subtilis*; *Bacillus sp*; *B. atrophaeus*; *B. halotolerans*; *B. amyloliquefasciens* et *B. paralicheniformis*). Les espèces de *Bacillus* ont un large éventail d'activités de biocontrôle contre divers phytopathogènes (Jinal *et al.*, 2020) grâce à la formation des endospores (Chen *et al.*, 2020) qui leur permet de survivre dans des conditions de stress (Secaira-Morocho *et al.*, 2020). Actuellement, plusieurs espèces du genre *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. amyloliquefasciens*, *B. licheniformis* et *B. pumilus*) sont, largement, étudiées pour atténuer l'incidence des maladies de l'agriculture. Elles ont été identifiées comme BCA et sont considérées comme de bons candidats pour la lutte biologique (Attia *et al.*, 2020). Elles empêchent l'établissement et le développement de pathogènes végétaux par différents mécanismes (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018).

Afin d'obtenir un éventuel antagonisme synergique vis-à-vis du FOA, la coculture des souches bactériennes est réalisée. L'association d'agents de biocontrôle est parfois nécessaire pour augmenter leur capacité à supprimer plusieurs agents pathogènes (Palmieri *et al.*, 2017). Les taux d'inhibition des souches combinées ont enregistré un maximum de 58,77 %. En comparaison avec l'activité antifongique des bactéries en monoculture et coculture, aucune différence significative n'a été rapportée. Cependant, le mélange d'agents de lutte biologique peut entraîner une augmentation, une diminution ou des effets similaires de suppression des agents pathogènes (Mukherjee *et al.*, 2021). De plus, de nouvelles études ont prouvé que la compatibilité et la diversité taxonomique sont les deux principaux facteurs responsables du succès de la combinaison entre plusieurs souches d'agents de biocontrôle (Niu *et al.*, 2020 ; Saidi *et al.* ; 2021). La compatibilité est définie comme la possibilité de croître en coculture *in vitro* sans que l'une n'inhibe la croissance de l'autre (Thomloui *et al.*, 2019). De plus, combiner des agents de biocontrôle avec une distance taxonomique semble souhaitable, car la quantité et le nombre de métabolites secondaires qui inhibent la croissance des agents pathogènes augmentent avec l'augmentation de la diversité taxonomique (Niu *et al.*, 2020). Les souches bactériennes de la présente étude sont compatibles mais appartiennent toutes au même genre *Bacillus*. En

effet, le manque de diversité taxonomique entre ces souches bactériennes lors de la combinaison peut expliquer le manque d'amélioration des taux d'inhibition.

La production de métabolites par des bactéries antagonistes est essentielle pour aider la plante à lutter contre les maladies fongiques en interférant avec la croissance et les activités des pathogènes. La suppression des agents pathogènes repose sur la synthèse d'antibiotiques, de peptides antimicrobiens, de bactériocines, de toxines et d'enzymes lytiques (Jiao *et al.*, 2021). L'effet antifongique des surnageants bactériens seuls ou combinés *in vitro* a montré une activité inhibitrice sur la croissance de FOA. Plusieurs surnageants obtenus à partir de *Bacillus spp.* ont démontré une activité contre les agents pathogènes. Cependant, nos résultats ont montré que les pourcentages d'inhibition des surnageants bactériens seuls (souches 333, 84 et 249) et de leurs combinaisons étaient proches. Ceci prouve qu'il n'y a pas d'effet synergique ou additif entre les différents surnageants bactériens. En effet, la capacité d'inhibition des surnageants avec leurs métabolites est liée à la présence de lipopeptides, dont les iturines, les fengycines, les surfactines et les sphingofungines (Pellegrini *et al.*, 2020). Le succès de la combinaison de bactéries dans le biocontrôle est conditionné lorsque les souches individuelles exercent des mécanismes complémentaires de suppression de la maladie (Wang *et al.*, 2021). Lorsqu'un mécanisme s'avère inefficace dans des conditions particulières, les autres peuvent le compenser. Ainsi, la combinaison de souches ayant différents modes d'action peut augmenter la possibilité de construire un mélange efficace et cohérent contre les pathogènes des plantes (Ruano-Rosa *et al.*, 2014). Néanmoins, la combinaison d'agents de biocontrôle peut donner des résultats non souhaitables sur l'augmentation de l'inhibition des agents phytopathogènes par rapport à l'utilisation du composant le plus efficace par une souche de biocontrôle seule (Alamri *et al.*, 2012).

En plus des métabolites diffusables, les VOCs sont également utilisés dans la suppression de nombreux agents pathogènes des plantes (Li *et al.*, 2020). L'effet antifongique des VOCs émis par les souches bactériennes sur la FOA a révélé des taux d'inhibition très faibles. Seule la souche 260 présentait un taux d'inhibition moyen de 28,89 %. Les VOCs produits par *Bacillus spp.* peuvent inhiber la croissance et la germination des spores contre plusieurs champignons phytopathogènes (Wu *et al.*, 2019). Des études ont montré que l'inhibition par les VOCs varie considérablement selon les espèces fongiques. D'après les résultats obtenus par Che *et al.* 2017, les volatiles de *Lysinibacillus sp.* FJAT-4748 n'a pas affecté la croissance de tous les champignons pathogènes de la même manière. Les

différences observées dans les sensibilités fongiques aux VOCs bactériens peuvent s'expliquer par des différences dans les propriétés physiologiques et pathogènes, l'effet inhibiteur sur un agent pathogène dépendant du site d'action ou la capacité des agents pathogènes fongiques à détoxifier les substances volatiles (Chaves-López *et al.*, 2015). Cependant, la nature des VOCs varie également selon les souches de biocontrôle. Quatre substances volatiles identifiées (méthylisobutylcétone, éthanol, 5-méthyl-2-heptanone et S-(-)-2-méthylbutylamine) produites par *B. pumilus* TM-R sont responsables de l'inhibition de *F. oxysporum* et d'autres champignons phytopathogènes (Morita *et al.*, 2019). Parmi les VOCS détectés chez *B. licheniformis*, le 3-méthyl-1-butanol est le composé le plus abondant responsable de l'inhibition des champignons mycotoxiques (Huang *et al.*, 2014). Ngo *et al.* (2021) ont décrit que *B. amyloliquefaciens* NJN-6 était capable de produire 11 VOCS et d'inhiber la croissance de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. De plus, l'activité antifongique des VOCs produites par les espèces de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* et *B. velezensis* contre les principaux phytopathogènes, *in vitro*, a été étudiée (Toral *et al.*, 2021).

Pour évaluer l'effet de biocontrôle *in vivo*, les souches bactériennes sont testées sur des graines germées de palmier dattier infectées par FOA. La majorité des souches testées ont montré des effets fongistatiques légers à modérés. Cependant, le traitement avec la souche 260 réduit significativement le taux d'infection à 15 % ainsi que la taille de la nécrose. Plusieurs auteurs se sont demandés si la sélection *in vitro* d'agents de biocontrôle garantissait le succès *in planta*? Cependant, des expériences plantaires ont montré que les souches ayant de meilleures activités antifongiques *in vitro* ne sont pas toujours performantes *in vivo* et vice versa (Besset-Manzoni *et al.*, 2019). En effet, certaines souches comme la 260 qui a montré des résultats de biocontrôle satisfaisants sur graines de palmier mais son antagonisme envers FOA *in vitro* est limité (faible taux d'inhibition).

Les souches bactériennes qui présentent une meilleure activité inhibitrice *in vitro* ne sont pas toujours efficaces *in vivo*. Comme dans notre cas, la souche 333 isolée d'un sol non rhizosphérique a montré des taux d'inhibition significatifs *in vitro* mais une faible capacité à protéger les graines de palmier contre la FOA. Ceci peut s'expliquer par une colonisation insuffisante des racines du palmier contrairement à la souche endophyte 260 caractérisée par sa capacité compétitive de colonisation présentant ainsi de meilleurs résultats de biocontrôle *in vivo*. Les résultats de la présente étude sont en accord avec ceux obtenus par Dihazi *et al.* (2012) qui ont prouvé que le prétraitement des racines du palmier dattier avec les deux souches de *B. amyloliquefaciens* Ag et *Burkholderia cepacia* Cs réduisait

significativement la taille de la zone de brunissement autour du site d'inoculation du FOA, conduisant à une nécrose localisée. Lorsque les symptômes de la nécrose formée sont réduits, les plantes sont plus résistantes à la maladie du Bayoud. Le biocontrôle s'explique principalement par plusieurs mécanismes d'action qui agissent seuls ou ensemble pour conférer à la plante une meilleure résistance aux maladies : compétition pour l'espace et les nutriments, production de substances inhibitrices (lipopeptides, antibiotiques, composés volatils, enzymes lytiques, etc.) et induction de la résistance systémique.

La compétition pour les niches et les nutriments est un aspect impliqué par les bactéries dans le contrôle biologique (Morales-Cedeno *et al.*, 2021). En effet, leur capacité à coloniser les racines constitue la première étape fondamentale dans la protection des plantes contre les pathogènes végétaux. Le système racinaire est une niche riche en nutriments qui sert de chimio attractant pour la colonisation microbienne (Santhanam *et al.*, 2019). Cependant, la compétence et/ou la colonisation des bactéries est principalement liée à leur capacité à profiter et à s'adapter à un environnement spécifique (Wang *et al.*, 2021). Le processus de colonisation repose sur la fixation et l'établissement des bactéries sur la racine et sur l'utilisation de ces nutriments végétaux (Posada *et al.*, 2018). Des études ont prouvé que la protection du palmier dattier contre la fusariose par les souches endo-rhizosphériques est bien plus liée à la capacité de colonisation des racines qu'à un phénomène d'antibiose. La performance des souches bactériennes est liée à leur croissance rapide et à leur pouvoir de colonisation racinaire assez élevé, qui leur permet d'être compétitives pour les sources de nutriments et, ainsi, d'occuper les sites racinaires avant le pathogène (Lamari *et al.*, 2014).

De plus, *Bacillus spp* font partie des rhizobactéries les plus étudiées qui déclenchent l'ISR chez les plantes (Miljaković *et al.*, 2020). Grâce à l'induction de réseaux de régulation hormonale, les bactéries peuvent rapidement déclencher des réponses de défense des plantes lorsqu'elles sont attaquées par un agent pathogène (Besset-Manzoni *et al.*, 2019). Les bactéries rhizosphériques et endophytes favorisent l'ISR chez les plantes grâce à la production de divers métabolites tels que des antibiotiques, des sidérophores, des VOCS et autres, considérés comme des éliciteurs d'ISR (Hashem *et al.*, 2019). Il a été rapporté que l'ISR déclenché par des bactéries commence au niveau de la racine, puis se propage à d'autres parties de la plante (Verma *et al.*, 2019). L'ISR provoquée par *B. subtilis* entraîne des modifications dans la composition de la paroi cellulaire de l'hôte, la production de protéines liées à la pathogenèse (PR) telles que les chitinases et les glucanases, et la synthèse de phytoalexines responsables de la résistance de l'hôte aux agents pathogènes

(Wang *et al.*, 2018). De plus, l'ISR active les enzymes antioxydantes responsables de l'élimination des ROS (Yu *et al.*, 2022). Des études récentes ont clairement montré le potentiel de *B. paralicheniformis* pour activer les enzymes de défense antioxydantes dans les plants de tomates infectés par *F. oxysporum* et prévenir les dommages oxydatifs grâce à des activités de piégeage des radicaux hydroxyles en supprimant l'apparition du flétrissement vasculaire (Jinal *et al.*, 2020). De plus, le séquençage du transcriptome réalisé par Jiang *et al.* (2019) a révélé que près d'un millier de gènes différentiellement exprimés sont liés au processus de déclenchement de l'ISR par *B. velezensis* F21 contre *F. oxysporum* f. sp. *niveum* (Fon), l'agent causal du flétrissement vasculaire de la pastèque. Ces agents particuliers de biocontrôle sont utilisés, non seulement, pour remplacer les pesticides chimiques mais, en outre, pour améliorer la croissance des plantes et atténuer divers stress environnementaux naturels (salinité, aridité, températures et pH extrêmes, etc.), ou liés à la contamination de l'environnement. Les membres du genre *Bacillus* sont les PGPB les plus importants possédant des caractéristiques uniques en tant que biopesticides, biofertilisants et bioremédiateurs.

Le potentiel PGP des souches sélectionnées est évalué *in vitro*. Tous les isolats ont montré des capacités de fixation de l'azote. La production d'AIA et la solubilisation des phosphates sont des traits communs à toutes les souches bactériennes. L'AIA est l'une des phytohormones les plus importantes et est considérée comme une molécule signal dans la régulation du développement des plantes (Kumar *et al.*, 2021). D'autre part, la capacité des PGPR à solubiliser le phosphate (P) a diverses fonctions physiologiques liées à la santé des plantes et à la résistance aux stress biotiques et abiotiques (Cui *et al.*, 2019). Notre étude a indiqué que la majorité des souches produisaient des sidérophores à l'exception des souches 333 et 83. Les sidérophores agissent comme des agents chélateurs spécifiques du fer ferrique. Certains PGPR améliorent la croissance des plantes en produisant des sidérophores extracellulaires, qui aident à contrôler plusieurs maladies des plantes (Jiao *et al.*, 2021). Ainsi, de faibles niveaux de fer empêchent les agents pathogènes des plantes de proliférer dans la zone racinaire de la plante. En revanche, les plantes peuvent utiliser ce complexe sidérophore-fer pour leur nutrition (Rabhi *et al.* 2018 ; Kaur *et al.*, 2021). Tous les isolats ont montré une fixation d'azote et une production de NH₃ et n'ont pas réussi à produire du HCN. La production d'ammoniac peut satisfaire la demande en azote des plantes hôtes et favorise l'élongation et la biomasse des racines. Lorsqu'il est produit en excès, il peut également assurer une défense contre les agents pathogènes des plantes en réduisant leur colonisation dans les plantes hôtes (Goswami et Deka, 2020). D'autre part,

l'acide cyanhydrique (HCN) est connu pour sa toxicité contre les agents pathogènes des plantes et la chélation des ions métalliques (Singh *et al.*, 2019). Toutes ces activités PGP sont caractéristiques des bactéries de biocontrôle (Vinayarani et Prakash, 2018).

Les enzymes hydrolytiques jouent un rôle très important dans le contrôle biologique des phytopathogènes. De nombreuses rhizobactéries et BCA synthétisent des enzymes hydrolytiques extracellulaires impliquées dans l'hydrolyse des composants de la paroi cellulaire fongique tels que la chitine, les protéines et la cellulose (Jadhav *et al.*, 2017). Ces enzymes empêchent également la germination des spores fongiques et contribuent à la dégradation des protéines (Ben Meftah *et al.*, 2018 ; Kaur *et al.*, 2021). Selon les résultats, différentes enzymes amylase, chitinase, cellulase, xylanase, protéase, estérase et pectinase sont produites. La chitinase était la plus abondante. La chitinase microbienne se détériore et détruit les parois cellulaires de nombreux parasites et agents pathogènes (Muniroh *et al.*, 2019). Il a été rapporté que l'effet antifongique de *B. subtilis* sur l'amincissement des hyphes fongiques est lié à la sécrétion de chitinase et de glucanase (Khan *et al.*, 2018). Plusieurs auteurs ont démontré que *Bacillus* sp inhibe la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes en se fixant sur leur paroi cellulaire et en libérant des enzymes lytiques (chitinase, protéase, cellulase), des sidérophores et du HCN. Par conséquent, ces composés antifongiques provoquent des fissures et des déformations dans les hyphes, ce qui entraîne une altération de la structure et des fonctions cellulaires en raison de la vacuolisation et des fuites de protoplastes (Radhakrishnan *et al.*, 2017).

La survie d'une souche introduite dans la rhizosphère est affectée par un certain nombre de facteurs abiotiques. En revanche, les souches tolérantes au stress peuvent être efficacement impliquées dans des environnements extrêmes où elles peuvent montrer une meilleure compétence dans la rhizosphère et une meilleure capacité compétitive (Cherif-Silini *et al.*, 2012 ; Silini *et al.* 2016 ; Praveen Kumar *et al.*, 2014). La tolérance des souches bactériennes à différents stress abiotiques est, aussi examinée, dans cette étude. Les résultats ont montré que la majorité des souches se développent à des concentrations de 400 mM de NaCl et 10 % de PEG. De plus, certaines souches tolèrent jusqu'à 1 200 mM de NaCl et 20 % de PEG. Ainsi, toutes les souches ont montré une capacité de croissance à des valeurs de pH élevées (pH9 et 11) et peuvent résister à des températures allant jusqu'à 50°C (Slama *et al.*, 2019 ; Chari *et al.* 2018). Les souches bactériennes présentent également une résistance à différentes concentrations de métaux lourds. Certaines souches sont capables de résister jusqu'à 500 ppm de mercure, 1 000 ppm de plomb et 500 ppm de cobalt. Néanmoins, la plupart ont réussi à croître à 100 ppm de cadmium. Cette tolérance

s'explique par plusieurs mécanismes de résistance observés par les PGPB (Ramakrishna *et al.*, 2020). Les PGPB réduisent la toxicité des métaux lourds en améliorant la croissance des cultures dans des conditions de sol pollué (Nazli *et al.*, 2020) ou lors de l'irrigation avec des eaux contenant des niveaux élevés de métaux lourds (Slama *et al.*, 2019). Il a été démontré que *B. licheniformis* améliore l'accumulation et la distribution de Cd, Cr, Pb, Cu et Zn dans les plantes cultivées dans un sol contaminé par des métaux lourds ; ce qui entraîne une réduction des niveaux de métaux toxiques dans le sol (Radhakrishnan *et al.*, 2017).

L'effet des souches bactériennes sur la promotion de la croissance du palmier dattier cultivé sur sol stérile sous le stress du FOA est évalué dans cette étude. L'infection par le FOA a réduit la hauteur des plantes, la longueur des racines et le poids frais et sec des feuilles et des racines et que l'inoculation bactérienne a montré un effet bénéfique significatif sur ces paramètres en présence du stress. Cela suggère que le traitement bactérien peut réduire efficacement le stress biotique en augmentant les paramètres de croissance du palmier. Ces résultats sont en accord avec les rapports précédents selon lesquels diverses maladies affectent négativement la croissance et le développement des plantes (Shi *et al.*, 2016 ; Aydi-Ben-Abdallah *et al.*, 2020 ; Attia *et al.*, 2022 ; Zakaria *et al.*, 2023). Il est bien établi que certaines bactéries favorisent la croissance des plantes en améliorant leur absorption et/ou leur efficacité d'utilisation des nutriments et leur tolérance au stress abiotique. Ces bactéries sont souvent qualifiées de biofertilisants et de biostimulants. La promotion de la croissance végétale doit être considérée comme un mécanisme qui peut contribuer au contrôle des maladies par la stimulation de la croissance des plantes par une meilleure absorption des nutriments et/ou en affectant les voies hormonales des plantes (Stenberg *et al.*, 2021). Ainsi, l'augmentation de la croissance des plantes peut réduire le risque d'infection. Il peut être difficile de séparer les effets de la promotion de la croissance microbienne des plantes et de l'antagonisme envers les agents pathogènes. Ces effets bénéfiques sur la croissance du palmier dattier pourraient dû à la capacité de nos souches bactériennes à fixer l'azote (N₂), à solubiliser le phosphate et à produire l'AIA et les sidérophores. Ces traits PGP améliorent le développement des racines et augmentent l'absorption des nutriments par la plante pour favoriser sa croissance (Khedher *et al.*, 2021). Cette capacité accrue d'absorption des nutriments pourrait contribuer à diminuer l'effet délétère de l'agent pathogène (Deketelaer *et al.*, 2017).

Les paramètres biochimiques tels que la chlorophylle, la proline, les sucres totaux et MDA sont également testé après l'inoculation par les souches bactériennes. Les résultats ont

montré que les teneurs en chlorophylle et en caroténoïdes sont améliorées après inoculation bactérienne tandis qu'une réduction remarquable des contenus en proline, en sucres totaux et en MDA est observée après application de ces souches. Des résultats antérieurs ont constaté que l'inoculation avec les souches de PGPR améliore les pigments photosynthétiques des plantes dans des conditions de stress. Cela correspond à une meilleure absorption des nutriments par la rhizosphère qui soutient la croissance des plantes dans des conditions stressantes (Kazerooni *et al.*, 2021). D'autres travaux réalisés par Jangir *et al.* (2018) ont prouvé l'efficacité de *Bacillus* sp. B44 sur l'amélioration des paramètres de croissance de la tomate infectée par *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. De plus, *B. subtilis* est capable de diminuer la peroxydation lipidique (MDA) et la proline dans les pommes de terre exposées au *F. oxysporum* (Lastochkina *et al.*, 2020).

La signalisation pendant le stress biotique provoque une génération excessive des ROS qui à leur tour endommagent les cellules végétales en provoquant un déséquilibre redox, une peroxydation lipidique, une dégradation de la chlorophylle, des acides nucléiques et des protéines (Sahu *et al.*, 2022). Néanmoins, les plantes ont des mécanismes de défense composés d'antioxydants à activité enzymatique ou non enzymatique pour survivre aux dommages oxydatifs et neutraliser l'oxydation excessive (Dumanović *et al.*, 2021). Kazerooni *et al.* (2021) ont signalé que les PGPR ont la capacité d'augmenter l'activité de ces antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. Dans la présente étude, l'activité des enzymes antioxydantes a diminué dans les plantes infectées, alors qu'elle a augmenté dans les plantes inoculées et exposées au stress du FOA. Il a été signalé que l'expression génique des principaux antioxydants et enzymes de défense, tels que l'ascorbate peroxydase (APX), la catalase (CAT), la peroxydase (POD), la glutathion peroxydase (GPX) et la polyphénol oxydase (PPO) est stimulée dans les plantes au cours du traitement par *Bacillus* spp. Cet agent de biocontrôle réduit la peroxydation lipidique et augmente les enzymes antioxydantes (APX, CAT, GPX, POD, PPO) et d'autres enzymes de défense telles que la chitinase et la β -1,3-glucanase pour atténuer les effets néfastes de l'infection par le pathogène en induisant une résistance systémique (Radhakrishnan *et al.*, 2017).

L'efficacité des différents traitements réalisés sur les paramètres morpho-biochimiques et enzymatiques des plantes de palmier en présence du stress pourrait également être due au potentiel de nos souches bactériennes à coloniser avec succès les sites racinaires lors de l'inoculation et d'exercer un effet compétitif pour l'espace et les nutriments conduisant à l'inhibition du pathogène et l'élimination du stress biotique. Andrić *et al.* (2020) ont signalé la capacité des *Bacillus* à coloniser les sites racinaires. Leur efficacité dans le

biocontrôle, ainsi que leur présence constante dans la niche fortement compétitive de la rhizosphère sont dues à leur fort potentiel de synthèse d'une large gamme de métabolites secondaires bioactifs solubles et volatils. Les *Bacillus* font partie des genres ayant le plus grand potentiel de survie. Leur capacité à former des spores augmente ainsi l'adaptation des souches à la formulation commerciale et à l'application sur le terrain. Ces bactéries sont connues comme des PGPR disponibles dans le commerce en raison de la stabilité de l'inoculant et la facilité de stockage du produit inoculant (Saadaoui *et al.*, 2022).

L'amélioration des paramètres de croissances du palmier dattier par les souches bactériennes sous stress biotique est également réalisé dans un sol non stérile, en utilisant les mêmes types de traitements. Les résultats ont montré ainsi que l'inoculation par les souches bactériennes a augmenté significativement les paramètres morpho-biochimiques des plantes exposées aux stress du FOA. Une amélioration de l'activité des enzymes anti-oxydantes (APX, CAT, GPX, SOD) suite à l'inoculation des souches bactériennes est aussi, constatée. Les espèces de *Bacillus* sont bien documentées pour leur capacité à améliorer la croissance des plantes et à protéger les plantes hôtes contre les infections provoquées par les pathogènes (Baard *et al.*, 2023). La sélection de micro-organismes ayant un effet antagoniste sur l'agent pathogène est un critère très important. Les antagonistes doivent être efficaces *in situ* avec la capacité de compétition ou d'antibiose et être capables de coloniser rapidement les racines des plantes. Par conséquent, le développement d'un agent de biocontrôle efficace nécessite une stratégie de sélection qui doit prendre en compte plusieurs paramètres. L'interaction ou la communication entre les plantes et les rhizobactéries se fait par des signaux chimiques émis par les deux partenaires. La structure de la communauté rhizobactérienne est affectée par plusieurs facteurs dont le génotype de la plante et est déterminée par la quantité et la composition des exsudats racinaires (Marschner *et al.*, 2004). De nombreuses bactéries bénéfiques répondent activement aux exsudats racinaires en ajustant leur programme transcriptionnel vers les traits impliqués dans la colonisation racinaire, l'activation de l'ISR, la chimiotaxie, la formation de biofilm et le métabolisme énergétique qui sont importants pour inhiber les agents pathogènes et la progression de la maladie (Ali *et al.*, 2023). De nombreux mécanismes bénéfiques des PGPR influencent, également, la plante pour qu'elle exsude une variété de produits dans la rhizosphère, qui profitent indirectement à la plante pour recruter plus de PGPR ou d'augmenter la libération de molécules piégeant les nutriments. Les PGPR peuvent altérer le fonctionnement de la rhizosphère en affectant le profil d'exsudation des racines interférant ainsi dans le recrutement du microbiome dans la

rhizosphère (Alzate *et al.*, 2020). Il a été prouvé que l'inoculation de PGPR modifie les profils phénoliques des exsudats racinaires du gombo ce qui peut attirer un microbiote rhizosphérique plus bénéfique pour une meilleure résistance aux agents pathogènes (Ray *et al.*, 2018). D'un autre côté, lorsque les plantes sont attaquées par des agents pathogènes du sol, les signaux de stress induits modifient les profils d'exsudation des racines, entraînant des changements dans la composition et l'activité de la communauté microbienne du sol. De tels changements dans la communauté microbienne pourraient à leur tour supprimer l'activité des agents pathogènes du sol via la production d'antibiotiques et la concurrence de niche (Guo *et al.*, 2021).

Les PGPR s'engagent également dans une pléthore d'activités antimicrobiennes, prédatrices ou communautaires inter-espèces qui influencent finalement la plante de manière bénéfique, considérées comme des interactions indirectes avec la plante (Rosier *et al.*, 2018).

L'activation de l'ISR a été signalée comme un facteur important de la résistance aux maladies médiée par la plupart des PGPR chez les plantes (Ali *et al.*, 2023). Il a été démontré que la présence de souches induisant l'ISR peut entraîner davantage la sécrétion racinaire de composés antimicrobiens de coumarine qui façonnent le microbiote racinaire et mobilisent des bactéries potentiellement bénéfiques, y compris les souches induisant l'ISR. Cela suggère une boucle d'immunité et de recrutement auto-renforcée, qui constitue un outil prometteur pour manipuler les fonctions bénéfiques du microbiote pour une protection stable des plantes à travers les générations (Vannier *et al.*, 2019).

Des études sur le mode d'action ont révélé que le biocontrôle par les PGPR implique la production de métabolites qui réduisent la population ou les activités des agents pathogènes ou de la microflore délétère de la rhizosphère. Il a été signalé que *B. subtilis* a réduit l'effet nocif de *F. oxysporum* l'agent causal du flétrissement de la tomate. Les semences de tomates traitées avec *B. subtilis* et semées dans un sol infesté de *F. oxysporum* ont produit moins de plantes infectées que celles traitées uniquement avec l'agent pathogène et avait également amélioré certains paramètres de croissance tels que les poids frais et sec des pousses et des racines (Elshahat *et al.*, 2016). Ainsi, il a été suggéré que *B. subtilis* est capable de réduire la gravité des maladies non seulement en inhibant directement la croissance des agents pathogènes, mais également en réduisant leur virulence. L'induction de gènes de virulence chez de nombreux agents pathogènes repose sur des signaux de détection de quorum (QS) en tant que régulateurs, et donc interférer avec les signaux QS impliqués dans l'induction de gènes de virulence pourrait être une

stratégie prometteuse pour réduire la gravité de la maladie. Il a été démontré que *B. subtilis* produit une enzyme, AIA, qui est capable d'inactiver les autoinducteurs de QS (Blake *et al.*, 2021).

L'une des causes de la variabilité du succès de la lutte biologique dans les conditions de terrain pourrait être les microbiomes naturels des plantes (Blake *et al.*, 2021). Lors de l'application des BCA dans des milieux naturels, les BCA n'agissent pas indépendamment de leur environnement mais interagissent avec de nombreux micro-organismes indigènes pour devenir des composants des communautés microbiennes locales. Les membres de tels consortiums peuvent développer des interactions microbiennes spécifiques à une niche pour influencer la santé des plantes. La modulation des éléments génétiques et la suppression d'une gamme plus large de phytopathogènes peuvent expliquer l'activité élevée de lutte biologique dans les communautés microbiennes (Niu *et al.*, 2020). Des stratégies émergentes telles que l'ingénierie du microbiome peuvent détecter, moduler et améliorer directement ou indirectement les traits et les performances des souches de *Bacillus*. De nouvelles recherches sur les interactions plantes-bactéries révèlent la capacité des plantes à façonner leur rhizosphère et leur microbiome endorhize (Miljaković *et al.*, 2020). En particulier, de nombreuses études *in situ* ont montré que les inoculants de *Bacillus* pouvaient modifier la structure et la fonctionnalité du microbiome indigène du sol et des plantes (Mawarda *et al.*, 2022).

Comprendre la structure et la fonction des communautés microbiennes pourrait permettre d'apprécier et de mettre en valeur le potentiel de ces inoculants bactériens. Les inoculants bactériens doivent être présents dans la rhizosphère végétale à une densité de biomasse suffisante et pendant une durée suffisante pour avoir un effet actif, notamment pour la protection des cultures. Cela dépend de la capacité de l'inoculant bactérien à proliférer et à coloniser efficacement le système racinaire, ce qui est largement considéré comme l'étape limitante du contrôle biologique. La lutte biologique peut être inefficace *in situ* en raison d'une mauvaise colonisation des bactéries dans la rhizosphère (Ahmed *et al.*, 2023). Ainsi, la rigueur accrue dans la sélection des antagonistes afin d'obtenir des souches ayant toutes les capacités à éliminer le champignon, et leur persistance dans le sol, après inoculation sont déterminantes pour la réussite de leur colonisation et de l'établissement de la population dans la rhizosphère (Daayf *et al.*, 2003). L'objectif principal du biocontrôle est d'établir une communauté microbienne saine dans le sol qui peut supprimer la croissance et la propagation des agents pathogènes des plantes. Ceci est réalisé en introduisant des

bactéries bénéfiques qui peuvent supplanter les agents pathogènes pour les ressources, produire des composés antimicrobiens et stimuler la croissance naturelle de la plante. Plusieurs approches différentes de la lutte biologique contre les maladies des plantes sont possibles. Le biocontrôle préventif consiste à prendre des mesures pour prévenir le développement des maladies des plantes avant qu'elles ne surviennent grâce aux amendements du sol par les BCA. Dans le biocontrôle curatif, l'approche consiste à traiter des plantes qui sont déjà infectées. Les mesures de la lutte curative comprennent l'utilisation de BCA pour inhiber ou tuer l'agent pathogène à l'origine de la maladie (Moragrega *et al.*, 2021). Les mesures de lutte biologique concomitantes comprennent l'introduction de micro-organismes bénéfiques qui rivalisent avec l'agent pathogène pour les ressources. Les mesures de lutte biologique concomitantes peuvent être efficaces, mais elles sont souvent moins prévisibles que les mesures préventives ou curatives. En général, le biocontrôle préventif est l'approche la plus efficace pour contrôler les maladies des plantes. Les différents traitements appliqués dans cette étude quel que soit la nature du sol, stérile ou non ont montré que les BCA ont donné un effet significatif sur le processus de contrôle de la fusariose. Néanmoins, il semble que le traitement concomitant et préventif sont plus efficaces dans la lutte contre le pathogène par rapport au traitement curatif. Il est à noter également contrairement à la littérature que le traitement concomitant améliore les différents paramètres de croissance traduisant une protection de la plante par rapport au traitement préventif. Il paraît probable que le pathogène induit une expression précoce et massive des différents mécanismes de biocontrôle chez les bactéries.

Conclusion

Cette étude relative à l'utilisation des bactéries antagonistes pour contrôler la fusariose du palmier dattier constitue à l'heure actuelle un enjeu majeur. En effet, leur utilisation rentre dans le contexte de la lutte biologique des écosystèmes oasiens et la stimulation des défenses naturelles des palmiers dattiers dont la finalité est de réduire l'application de produits phytosanitaires et de restaurer la productivité des cultures en ces zones.

Le choix des bactéries antagonistes est un critère très important. Pour aboutir à une sélection efficace, 335 souches bactériennes sont isolées à partir du sol rhizosphérique sain et infecté, sol non rhizosphérique et à partir des racines saines et infectées des palmeraies de la wilaya de Ghardaïa.

Leur capacité de biocontrôle envers FOA est évaluée, *in vitro*, en utilisant le test de confrontation. 75 isolats ont montré une activité inhibitrice de la croissance du FOA. Les résultats obtenus indiquent que le nombre de bactéries endophytes et rhizosphériques antagonistes est supérieur à celui des bactéries non rhizosphériques.

Sur la base de leurs potentialités antagonistes envers le FOA, huit souches (83, 84, 300, 333, 322, 260, 249, 227) les plus performantes sont sélectionnées et testées pour leur capacité à inhiber les différentes souches de FOA et d'autres champignons phytopathogènes. Les résultats ont montré que toutes les souches bactériennes ont une action inhibitrice envers les champignons testés. Selon la séquence du gène de l'ARNr16S, toutes les souches appartiennent phylogénétiquement au genre *Bacillus*.

Les cultures bactériennes et les surnageants de culture acellulaires testés seuls ou en coculture ont montré une activité inhibitrice envers FOA. Cependant, l'effet de la coculture n'a montré aucune synergie dans les deux cas. Contrairement aux composés diffusibles, les composés organiques volatiles (VOCs) n'ont pas montré de capacité antifongique significative.

Le concept de sélection d'agents de lutte biologique *in vitro* ne garantit pas toujours la performance *in vivo*. Pour évaluer leur effet de biocontrôle *in vivo*, les souches bactériennes sont testées sur des graines de palmier dattier infectées par FOA. Après 45 jours d'incubation, la majorité des souches ont prouvé leur effet de biocontrôle plus particulièrement la souche *B. paralicheniformis* 260 qui protégeait significativement les graines du palmier dattier.

De plus, ces bactéries ont montré d'autres potentialités pour résister aux différentes conditions stressantes : température, pH, sécheresse et salinité. Les souches bactériennes ont également présenté une résistance élevée à différentes concentrations de métaux lourds.

Les souches bactériennes ont prouvé également leur capacité à améliorer la croissance des plantes directement (fixation d' N_2 , solubilisation des phosphates, production d'AIA) et indirectement (production de sidérophore, d' NH_3 et d'enzymes lytiques).

Les résultats de l'inoculation du palmier dattier par les bactéries en présence du FOA ont montré que les souches bactériennes ont modulé les paramètres morpho-biochimiques des plantes cultivées aussi bien sur sol stérile que non stérile. L'inoculation des plantes avec ces souches a augmenté la longueur, les masses fraîches et sèches des feuilles et des racines ainsi que les pigments chlorophylliens (a,b et totale et caroténoïdes). Par contre, les niveaux de proline, sucres et MDA ont diminué par rapport à ceux des plantes non inoculées et exposés au stress du FOA. Les isolats bactériens ont ainsi amélioré l'activité des enzymes antioxydantes (GPX, SOD, CAT, APX) en présence du stress biotique.

En résumé, l'exploitation des espèces de *Bacillus* indigènes de la rhizosphère du palmier dattier, ayant une résistance à large spectre contre plusieurs contraintes environnementales, offre des avantages potentiels pour une agriculture durable. Le genre *Bacillus*, selon ses propriétés physiologiques et métaboliques répond à ces exigences pour devenir un produit de lutte biologique commercial.

Enfin, des travaux supplémentaires seront menés pour valider les résultats sur le terrain. Les recherches futures cibleront la possibilité de développer une formulation appropriée et des techniques d'application pour assurer ou renforcer la résistance du palmier dattier contre FOA. Ces résultats encouragent de nouvelles recherches sur l'utilisation de la métabolomique permettant de détecter le profil des métabolites présents dans les plantes inoculées et infectées en les comparant avec des plantes témoins. A l'avenir, c'est bien de détecter et de maîtriser les gènes de virulence responsables de la pathogénicité du FOA.

Références bibliographiques

Abdallah, D. B., Krier, F., Jacques, P., Tounsi, S. and Frikha-Gargouri, O. (2020). *Agrobacterium tumefaciens* C58 presence affects *Bacillus velezensis* 32a ecological fitness in the tomato rhizosphere, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **27**(22), 28429–28437.

Abdullah, S. K., Lorca, L., & Jansson, H. (2010). Diseases of date palms (*Phoenix dactylifera* L.). *Basrah Journal for Date Palm Researches*, **9**(2), 1-44.

Abedalred, E.M., Ismail, W.M., Abdulmoohsin, R.G., Al-Karhi, M.A. (2019). First molecular identification of *Fusarium fujikuroi* causing pollen rot of palm trees (*Phoenix dactylifera* L.) in Iraq and evaluation efficacy of some nanoparticles against it. In Proceedings of the IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Bristol, UK, 1 November 2019.

Aberlenc-Bertossi. (2010). Biotechnologies du palmier dattier. Actes du 3e Séminaire du réseau AUF-BIOVEG, Montpellier (France) P16. 264p.

Abouamama, S., Nouredine, K., Anis, B., Sadika, H., Bouchra, O., Said, B., ... & Mebrouk, K. (2018). Pathogenicity and biological control of Bayoud disease by *Trichoderma longibrachiatum* and *Artemisia herba-alba* essential oil. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **8**(4), 161-167.

Abriouel, H., Franz, C. M., Omar, N. B., & Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS microbiology reviews*, **35**(1), 201-232.

Absi, R. (2013). Analyse de la diversité variétale du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.): Cas des Ziban (Région de Sidi Okba). Thèse de doctorat. Université Mohamed Khider-Biskra).

Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in enzymology*, **105**, 121-126.

Agrios, G.N., 2005. Plant pathology, 5th edition. Department of plant pathology. University of Florida; Elsevier Academic Press. pp. 948.

Ahmed, A., He, P., He, Y., Singh, B. K., Wu, Y., Munir, S., & He, P. (2023). Biocontrol of plant pathogens in omics era—with special focus on endophytic bacilli. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1-19.

Ahmed, Y., Hussien, A., El-badry, N., Soliman, M.S. (2019). Validation of a Diagnostic Protocol for the Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, the Causal Agent of Bayoud Disease of Date Palm. *Egypt. J. Phytopathol*, **47**, 297–312.

Akeed, Y., Atrash, F., Naffaa, W. (2020). Partial purification and characterization of chitinase produced by *Bacillus licheniformis* B307. *Heliyon*, **6**, e03858.

Al-Alawi, R. A., Al-Mashiqri, J. H., Al-Nadabi, J. S., Al-Shihi, B. I., & Baqi, Y. (2017). Date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.): natural products and therapeutic options. *Frontiers in plant science*, **8**, 845.

- Alamri, S., Hashem, M., & Mostafa, Y. S. (2012).** In vitro and in vivo biocontrol of soil-borne phytopathogenic fungi by certain bioagents and their possible mode of action. *Biocontrol Science*, **17**(4), 155-167.
- Alenezi, F. N., Slama, H. B., Bouket, A. C., Cherif-Silini, H., Silini, A., Luptakova, L., ... & Belbahri, L. (2021).** *Bacillus velezensis*: A treasure house of bioactive compounds of medicinal, biocontrol and environmental importance. *Forests*, **12**(12), 1714.
- Al-fadhil, F., & Sharif, F. M. (2013).** Control of inflorescence rot of date palm by low rate trunk injection with Difenconazole in a large scale field trial. *Al-Kufa University Journal for Biology*, **5**(1).
- Ali, S., Tyagi, A., & Bae, H. (2023).** Plant Microbiome: An Ocean of Possibilities for Improving Disease Resistance in Plants. *Microorganisms*, **11**(2), 392.
- Al-Naemi, F. A., Ahmed, T. A., Nishad, R., & Radwan, O. (2016).** Antagonistic effects of *Trichoderma harzianum* isolates against *Ceratocystis radicola*: pioneering a biocontrol strategy against black scorch disease in date palm trees. *Journal of Phytopathology*, **164**(7-8), 464-475.
- Al-Sharidah, A. (2017).** Report of Black Scorch Disease on Date Palm Trees in the State of Kuwait. *Am. Acad. Sci. Res. J. Eng. Technol. Sci*, **28**, 14–17.
- Alzate, M., Oliveira, A. L., Valentinuzzi, F., Rodrigues, E., Pii, Y., Cesco, S., et al. (2020).** Inoculation with plant growth-promoting bacteria alters the rhizosphere functioning of tomato plants. *Appl. Soil Ecol.* **158** :103784.
- Amir, H., & Sabaou, N. (1983).** Date palm fusarioses. XII. Antagonism in the soil of two *actinomycetes* vis-a-vis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, (Bayoud). Mémoires de la Société d'Histoire naturelle de l'Afrique du Nord.
- Ammar, M. I., & El-Naggar, M. A. (2011).** Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fungal diseases in Najran, Saudi Arabia. *International journal of plant pathology*, **2**(3), 126-135.
- Amraoui, H., Sedra, M. H., & Hamdaoui, A. (2004).** Etude des sécrétions protéiques et enzymatiques du *Fusarium oxysporum* f. sp *albedinis* : agent causal de la fusariose vasculaire du palmier dattier. *Al awamia*, **109**(110), 47-62.
- Anckaert A, Arias AA, Hoff G, Calonne-Salmon M, Declerck S, Ongena M (2021).** The use of *Bacillus* spp. as bacterial biocontrol agents to control plant diseases. Microbial bioprotectants for plant disease management. Burleigh Dodds Series in Agricultural Science. Burleigh Dodds Science Publishing Limited, pp 247–300.
- Andrić, S., Meyer, T., & Ongena, M. (2020).** *Bacillus* responses to plant-associated fungal and bacterial communities. *Frontiers in microbiology*, **11**, 1350.
- Armstrong, G. M., & Armstrong, J. K. (1981).** Another approach to race classification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. *Phytopathology*, **71**(5), 474-478.

- Attia, M. S., El-Wakil, D. A., Hashem, A. H., & Abdelaziz, A. M. (2022).** Antagonistic effect of plant growth-promoting fungi against *Fusarium* wilt disease in tomato: In vitro and in vivo study. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **194**(11), 5100-5118.
- Attia, M.S., El-Sayyad, G.S., Abd Elkodous, M., El-Batal, A.I. (2020).** The effective antagonistic potential of plant growth-promoting rhizobacteria against *Alternaria solani*-causing early blight disease in tomato plant. *Sci. Hort*, **266**, 109289.
- Aydi-Ben-Abdallah, R., Jabnoun-Khiareddine, H., & Daami-Remadi, M. (2020).** *Fusarium* wilt biocontrol and tomato growth stimulation, using endophytic bacteria naturally associated with *Solanum sodomaeum* and *S. bonariense* plants. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, **30**, 1-13.
- Baard, V., Bakare, O. O., Daniel, A. I., Nkomo, M., Gokul, A., Keyster, M., & Klein, A. (2023).** Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus tequilensis* against four *Fusarium* species. *Pathogens*, **12**(2), 254.
- Baayen, R. P., Förch, M. G., Waalwijk, C., Bonants, P. J. M., Löffler, H. J. M., & Roebroek, E. J. A. (1998).** Pathogenic, genetic and molecular characterisation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*. *European Journal of Plant Pathology*, **104**, 887-894.
- Baayen, R. P., Van Dreven, F., Krijger, M. C., & Waalwijk, C. (1997).** Genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and *Fusarium redolens* f. sp. *dianthi*. *European Journal of Plant Pathology*, **103**, 395-408.
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., ... & Smith, D. L. (2018).** Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in plant science*, 1473.
- Báez-Astorga, P. A., Cázares-Álvarez, J. E., Cruz-Mendivil, A., Quiroz-Figueroa, F. R., Sánchez-Valle, V. I., & Maldonado-Mendoza, I. E. (2022).** Molecular and biochemical characterisation of antagonistic mechanisms of the biocontrol agent *Bacillus cereus* B25 inhibiting the growth of the phytopathogen *Fusarium verticillioides* P03 during their direct interaction *in vitro*. *Biocontrol Science and Technology*, **32**(9), 1074-1094.
- Bahriz, H., & Bouras, N. (2020).** Etude de la Maladie du Bayoud, le Comportement Variétal du Palmier Dattier vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* dans la Vallée du M'Zab. *Afr. Rev. Sci. Technol. Develop*, **5**, 41–60.
- Bakker, M. G., Glover, J. D., Mai, J. G., & Kinkel, L. L. (2010).** Plant community effects on the diversity and pathogen suppressive activity of soil *streptomycetes*. *Applied Soil Ecology*, **46**(1), 35-42.
- Barger, S. R., Hoefler, B. C., Cubillos-Ruiz, A., Russell, W. K., Russell, D. H., & Straight, P. D. (2012).** Imaging secondary metabolism of *Streptomyces* sp. Mg1 during cellular lysis and colony degradation of competing *Bacillus subtilis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **102**, 435-445.

Basu, A., Prasad, P., Das, S. N., Kalam, S., Sayyed, R. Z., Reddy, M. S., & El Enshasy, H. (2021). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability*, **13**(3), 1140.

Batson, A. M., Fokkens, L., Rep, M., & du Toit, L. J. (2021). Putative effector genes distinguish two pathogenicity groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **34**(2), 141-156.

Belaroussi, M. E. (2019). Etude de la production du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) variété Deglet Nour : cas des régions de Oued Mya et Oued Righ (Doctoral dissertation, 2019).

Belguedj, M. (2002). Caractéristiques des cultivars de dattier du Sud-est du Sahara Algérien.

Ben Abdallah. (1990). La phoeniculture Option Méditerranéennes, Sér. A 1 n° 11. Centre de Recherche Phoenicole. Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT). 16p.

Ben Mefteh, F., Daoud, A., Chenari Bouket, A., Thissera, B., Kadri, Y., Cherif-Silini, H., ... & Belbahri, L. (2018). Date palm trees root-derived endophytes as fungal cell factories for diverse bioactive metabolites. *International journal of molecular sciences*, **19**(7), 1986.

Ben Othman, Y., Reynes, M., Bouabidi, H. (1996). Le palmier dattier dans l'agriculture d'oasis des pays méditerranéens. CIHEAM, Journées Internationales sur le Palmier Dattier dans l'Agriculture d'Oasis des Pays Méditerranéens, du 24 au 27 avril, 1996, (Elche, Espagne), p.p. 210-211.

Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and molecular biology*, **35**, 1044-1051.

Benlarbi, L., Bellahcene, M., Mebarki, L., Vander Wauven, C., Cornu, B., & Moussaoui, A. (2018). Pathogenic and molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* isolates from different areas in southwest Algeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **17**(8), 1629-1635.

Benzohra, I. E., Megateli, M., & Berdja, R. (2015). Bayoud disease of date palm in Algeria: History, epidemiology and integrated disease management. *African Journal of Biotechnology*, **14**(7), 542-550.

Benzohra, I. E., Megateli, M., Elayachi, B. A., Zekraoui, M., Djillali, K., Bouafia, A., ... & Rekis, A. (2017). Integrated management of Bayoud disease on date palm (*Phoenix dactylifera* L.) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* in Algeria. *Journal Algérien des Régions Arides*, **14**, 93-100.

Besset-Manzoni, Y., Joly, P., Brutel, A., Gerin, F., Soudiere, O., Langin, T., & Prigent-Combaret, C. (2019). Does in vitro selection of biocontrol agents guarantee

success in planta? A study case of wheat protection against *Fusarium* seedling blight by soil bacteria. *PLoS One*, **14**(12), e0225655.

Blake, C., Christensen, M. N., & Kovács, Á. T. (2021). Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **34**(1), 15-25.

Borriss, R. (2014). *Bacillus*, a plant-beneficial bacterium. In *Principles of plant-microbe interactions: microbes for sustainable agriculture* (pp. 379-391). Cham: Springer international publishing.

Boucenna-Mouzali, B., Gaceb-Terrak, R., & Rahmania, F. (2017). GC–MS Analysis of Cell Wall-Bound Phenolic Compounds and Lignin Quantification in Date Palm Cultivars that are Resistant or Susceptible to *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Arabian Journal for Science and Engineering*, **43**(1), 63–71.

Bounaga, N., & Djerbi, M. (1990). Pathologie du palmier dattier. *Les systèmes agricoles oasiens*, 127-132.

Bozhüyük, K. A., Linck, A., Tietze, A., Kranz, J., Wesche, F., Nowak, S., ... & Bode, H. B. (2019). Modification and de novo design of non-ribosomal peptide synthetases using specific assembly points within condensation domains. *Nature chemistry*, **11**(7), 653-661.

Cao, Y., Zhang, Z., Ling, N., Yuan, Y., Zheng, X., Shen, B., & Shen, Q. (2011). *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. *Biology and fertility of soils*, **47**, 495-506.

Cappuccino JC., & Sherman N. (1992). Negative staining. In: Cappuccino JC, Sherman N, editors *Microbiology: A Laboratory Manual*. Benjamin/Cummings : Redwood City. 125-179.

Carmona-Hernandez, S., Reyes-Pérez, J. J., Chiquito-Contreras, R. G., Rincon-Enriquez, G., Cerdan-Cabrera, C. R., & Hernandez-Montiel, L. G. (2019). Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: A review. *Agronomy*, **9**(3), 121.

Castillo, J. D., Lawrence, K. S., & Kloepper, J. W. (2013). Biocontrol of the reniform nematode by *Bacillus firmus* GB-126 and *Paecilomyces lilacinus* 251 on cotton. *Plant Disease*, **97**(7), 967-976.

Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in microbiology*, **10**, 302.

Chabrolin, C. (1930). Les maladies du Dattier (Suite et fin). *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, **10**(108), 661-671.

Chakroune, K., Bouakka, M., Lahlali, R., & Hakkou, A. (2008). Suppressive effect of mature compost of date palm by-products on *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Plant Pathology Journal*, **7** :148–154.

- Chari, K.D., Reddy, R.S., Triveni, S., Trimurtulu, N., Rani, C.V.D., Sreedhar, M. (2018).** Isolation and characterization of abiotic stress tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp. from different rhizospheric soils of Telangana. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia*, **15**, 485–494.
- Chaves-López, C.; Serio, A.; Gianotti, A.; Sacchetti, G.; Ndagijimana, M.; Ciccarone, C.; Stellarini, A.; Corsetti, A.; Paparella, A. (2015).** Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. *J. Appl. Microbiol*, **119**, 487–499.
- Che, J., Liu, B., Liu, G., Chen, Q., Lan, J. (2017).** Volatile organic compounds produced by *Lysinibacillus* sp. FJAT-4748 possess antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Biocontrol Sci. Technol*, **27**, 1349–1362.
- Cheffi, M., Chenari Bouket, A., Alenezi, F.N., Luptakova, L., Belka, M., Vallat, A., Rateb, M.E., Tounsi, S., Triki, M.A., Belbahri, L. (2019).** *Olea europaea* L. root endophyte *Bacillus velezensis* OEE1 counteracts oomycete and fungal harmful pathogens and harbours a large repertoire of secreted and volatile metabolites and beneficial functional genes. *Microorganisms*, **7**, 314.
- Chen, K., Tian, Z., He, H., Long, C. A., & Jiang, F. (2020).** *Bacillus* species as potential biocontrol agents against citrus diseases. *Biological control*, **151**, 104419.
- Chen, L., Shi, H., Heng, J., Wang, D., & Bian, K. (2019).** Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of the peanut endophyte *Bacillus velezensis* LDO2. *Microbiological research*, **218**, 41-48.
- Cherif-Silini, H., Silini, A., Chenari Bouket, A., Alenezi, F.N., Luptakova, L., Bouremani, N., Nowakowska, J.A., Oszako, T., Belbahri, L. (2021).** Tailoring next generation plant growth promoting microorganisms as versatile tools beyond soil desalinization: A road map towards field application. *Sustainability*, **13**, 4422.
- Cherif-Silini, H., Silini, A., Yahiaoui, B., Ouzari, I., Boudabous, A. (2016).** Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of *Bacillus* isolated from the wheat rhizosphere. *Ann. Microbiol*, **66**, 1087–1097.
- Cherif-Silini, H., Thissera, B., Chenari Bouket, A., Saadaoui, N., Silini, A., Eshelli, M., Alenezi, F.N., Vallat, A., Luptakova, L., Yahiaoui, B., et al. (2019).** Durum wheat stress tolerance induced by endophyte *Pantoea agglomerans* with genes contributing to plant functions and secondary metabolite arsenal. *Int. J. Mol. Sci*, **20**, 3989.
- Choudhary, D.K., Johri, B.N. (2009).** Interactions of *Bacillus* spp. and plants—With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiol. Res*, **164**, 493–513.
- Cortese, I. J., Castrillo, M. L., Onetto, A. L., Bich, G. Á., Zapata, P. D., & Laczeski, M. E. (2021).** De novo genome assembly of *Bacillus altitudinis* 19RS3 and *Bacillus altitudinis* T5S-T4, two plant growth-promoting bacteria isolated from *Ilex paraguariensis* St. Hil.(yerba mate). *Plos one*, **16**(3), e0248274.

- Cui, W., He, P., Munir, S., He, P., Li, X., Li, Y., Li, Y., Wu, J., Wu, Y., Yang, L., et al. (2019).** Efficacy of plant growth promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* B9601-Y2 for biocontrol of southern corn leaf blight. *Biol. Control*, **139**, 104080.
- Daayf, F., Adam, L., & Fernando, W. G. D. (2003).** Comparative screening of bacteria for biological control of potato late blight (strain US-8), using invitro, detached-leaves, and whole-plant testing systems. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **25**(3), 276-284.
- De la Perrière, R. B., Amir, H., & Bounaga, N. (1995).** Prospects for integrated control of 'bayoud'(Fusarium wilt of the date palm) in Algerian plantations. *Crop Protection*, **14**(3), 227-235.
- De Lamo, F. J., & Takken, F. L. (2020).** Biocontrol by *Fusarium oxysporum* using endophyte-mediated resistance. *Frontiers in Plant Science*, **11**, 37.
- De Souza, R. S. C., Armanhi, J. S. L., Damasceno, N. D. B., Imperial, J., & Arruda, P. (2019).** Genome sequences of a plant beneficial synthetic bacterial community reveal genetic features for successful plant colonization. *Frontiers in Microbiology*, **10**, 1779.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... & Foster, G. D. (2012).** The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, **13**(4), 414-430.
- Deketelaere, S., Tyvaert, L., França, S. C., & Höfte, M. (2017).** Desirable traits of a good biocontrol agent against *Verticillium* wilt. *Frontiers in microbiology*, **8**, 1186.
- Deleu, M., Lorent, J., Lins, L., Brasseur, R., Braun, N., El Kirat, K., ... & Mingeot-Leclercq, M. P. (2013).** Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1828**(2), 801-815.
- DeVay, J. E., Stapleton, J. J., & Elmore, C. L. (1991).** Historical review and principles of soil solarization.
- Devi, S., Sharma, S., Tiwari, A., Bhatt, A. K., Singh, N. K., Singh, M., ... & Kumar, A. (2023).** Screening for Multifarious Plant Growth Promoting and Biocontrol Attributes in *Bacillus* Strains Isolated from Indo Gangetic Soil for Enhancing Growth of Rice Crops. *Microorganisms*, **11**(4), 1085.
- Dewi, R.T.K.; Mubarik, N.R.; Suhartono, M.T. (2016).** Medium optimization of β -glucanase production by *Bacillus subtilis* SAHA 32.6 used as biological control of oil palm pathogen. *Emir. J. Food Agric*, **28**, 116–125.
- Di Pietro, A., Garc´ia-MacEira, F. I., M´eglecz, E., and Roncero, M. I. (2001).** A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **39** : 1140-1152.
- D´ıaz-Valle, A., L´opez-Calleja, A. C., & Alvarez-Venegas, R. (2019).** Enhancement of pathogen resistance in common bean plants by inoculation with *Rhizobium etli*. *Frontiers in Plant Science*, **10**, 1317.

- Dihazi, A., Jaiti, F., Jaoua, S., Driouich, A., Baaziz, M., Daayf, F., Serghini, M.A. (2012).** Use of two bacteria for biological control of bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seedlings. *Plant Physiol. Biochem*, **55**, 7–15.
- Dimkić, I., Janakiev, T., Petrović, M., Degrassi, G., & Fira, D. (2022).** Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms-A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **117**, 101754.
- Djaya, L., Istifadah, N., Hartati, S., Joni, I.M. (2019).** *In vitro* study of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and endophytic bacteria antagonistic to *Ralstonia solanacearum* formulated with graphite and silica nano particles as a biocontrol delivery system (BDS). *Biocatal. Agric. Biotechnol*, **19**, 101153.
- Djerbi, M. (1982).** Bayoud disease in North Africa: history, distribution, diagnosis and control. *Date Palm Journal* **1**, 153–197.
- Djerbi, M. (1983).** Diseases of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Diseases of the date palm (Phoenix dactylifera L.)*.
- Djerbi, M. (1990).** Méthodes de diagnostic du bayoud du palmier dattier 1. *EPPO Bulletin*, **20**(4), 607-613.
- Djerbi, M. (1994).** *Précis de Phéniciculture*. ED.; FAO: Rome, Italy, p. 192.
- Djerbi, M. 1988.** Les Maladies du Palmier Dattier. Projet Régional de Lutte Contre le Bayoud; FAO: Alger, Algeria, p. 127.
- Dobrzyński, J., Jakubowska, Z., Kulkova, I., Kowalczyk, P., & Kramkowski, K. (2023).** Biocontrol of fungal phytopathogens by *Bacillus pumilus*. *Frontiers in Microbiology*, **14**.
- Dong, H., Gao, R., Dong, Y., Yao, Q., & Zhu, H. (2023).** *Bacillus velezensis* RC116 Inhibits the Pathogens of Bacterial Wilt and *Fusarium* Wilt in Tomato with Multiple Biocontrol Traits. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**(10), 8527.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956).** Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem*, **28**, 350–356.
- Dubost, D., Hetner, P. (1968).** La lutte contre le Bayoud, problèmes et méthodes. Service de la botanique, Faculté des sciences, Université d'Alger, 16 p.
- Dumanović, J., Nepovimova, E., Natić, M., Kućka, K., Jaćević, V. (2021).** The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview. *Front. Plant Sci*, **11**.
- Duniway, J. M. (2002).** Status of chemical alternatives to methyl bromide for pre-plant fumigation of soil. *Phytopathology*, **92**(12), 1337-1343.

- Dutta, S., Woo, E. E., Yu, S. M., Nagendran, R., Yun, B. S., & Lee, Y. H. (2019).** Control of anthracnose and gray mold in pepper plants using culture extract of white-rot fungus and active compound schizostatin. *Mycobiology*, **47**(1), 87-96.
- El Hadrami, A., El Idrissi-Tourane, A., El Hassni, M., Daayf, F., & El Hadrami, I. (2005).** Toxin-based in-vitro selection and its potential application to date palm for resistance to the bayoud *Fusarium* wilt. *Comptes Rendus Biologies*, **328**(8), 732-744.
- El Hassni, M., El Hadrami, A., Daayf, F., Chérif, M., Barka, E. A., & El Hadrami, I. (2007).** Biological control of bayoud disease in date palm: Selection of microorganisms inhibiting the causal agent and inducing defense reactions. *Environmental and Experimental Botany*, **59**(2), 224-234.
- El Modafar, C. (2010).** Mechanisms of date palm resistance to Bayoud disease: Current state of knowledge and research prospects. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **74**(5-6), 287-294.
- El Modafar, C., Tantaoui, A., & El Boustani, E. S. (2001).** Differential induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in date palm roots in response to inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* and to elicitation with fungal wall elicitor. *Journal of Plant Physiology*, **158**(6), 715-722.
- Elshahat, M. R., Ahmed, A. A., Enas, A. H., & Fekria, M. S. (2016).** Plant growth promoting rhizobacteria and their potential for biocontrol of phytopathogens. *African Journal of Microbiology Research*, **10**(15), 486-504.
- EPPO. (2003).** EPPO Standards. Diagnostic protocols for regulated pests PM 7/16 *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 33, 245–247.
- Essarioui, A., & Sedra, M. H. (2017).** Lutte contre la maladie du bayoud par solarisation et fumigation du sol. Une expérimentation dans les palmeraies du Maroc. *Cahiers Agricultures*, **26**(4), 45010.
- Etesami H, Jeong BR, Glick BR (2023).** Biocontrol of plant diseases by *Bacillus* spp. *Physiol and Molec Plant Pathol* **126**:102048.
- FAO, (2017).** L'avenir de l'alimentation et de l'agriculture - tendances et défis. Rapport.
- FAO, (2022).** Report of Plant protection and production team at the FAO regional office for the Near East and North Africa.
- Felsenstein, J. (1981).** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**, 368–376.
- Fernandez D, Lourd M, Ouinten M, Tantaoui A et Geiger JP. (1995).** Le Bayoud du palmier dattier. Une maladie qui menace la phoeniciculture. *Phytoma*. La défense des végétaux. n° 469. Bayoud1.
- Fernandez, D., Ouinten, M., Tantaoui, A., Geiger, J. P., Daboussi, M. J., & Langin, T. (1998).** Fot 1 insertions in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* genome provide

diagnostic PCR targets for detection of the date palm pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(2), 633-636.

Fincheira, P., Parra, L., Mutis, A., Parada, M., & Quiroz, A. (2017). Volatiles emitted by *Bacillus* sp. BCT9 act as growth modulating agents on *Lactuca sativa* seedlings. *Microbiological Research*, **203**, 47-56.

Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of biotechnology*, **285**, 44-55.

Frederix, M.J.J.; Den Brader, K. (1989). Résultats des essais de désinfection des sols contenant des échantillons de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*.

Gao, Z., Zhang, B., Liu, H., Han, J., & Zhang, Y. (2017). Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, **105**, 27-39.

Gélis-Jeanvoine, S., Canette, A., Gohar, M., Caradec, T., Lemy, C., Gominet, M., ... & Slamti, L. (2017). Genetic and functional analyses of krs, a locus encoding kurstakin, a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis*. *Research in microbiology*, **168**(4), 356-368.

Goswami, M., Deka, S. (2020). Isolation of a novel rhizobacteria having multiple plant growth promoting traits and antifungal activity against certain phytopathogens. *Microbiol. Res*, **240**, 126516.

Guleria, S., Walia, A., Chauhan, A., & Shirkot, C. K. (2016). Molecular characterization of alkaline protease of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 involved in biocontrol of *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Food Microbiology*, **232**, 134-143.

Guo, Y., Luo, H., Wang, L., Xu, M., Wan, Y., Chou, M., ... & Wei, G. (2021). Multifunctionality and microbial communities in agricultural soils regulate the dynamics of a soil-borne pathogen. *Plant and Soil*, **461**, 309-322.

Hakkou, A., Chakroune, K., Souna, F., & Bouakka, M. (2012). La fusariose vasculaire du palmier dattier (Bayoud): Méthodes de lutte.

Hamm, P. B., Ingham, R. E., Jaeger, J. R., Swanson, W. H., & Volker, K. C. (2003). Soil fumigant effects on three genera of potential soilborne pathogenic fungi and their effect on potato yield in the Columbia Basin of Oregon. *Plant Disease*, **87**(12), 1449-1456.

Hashem, A., Tabassum, B., & Abd_Allah, E. F. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi journal of biological sciences*, **26**(6), 1291-1297.

Hassan, M.M.; Allam, M.A.; Shams El-Din, I.M.; Malhat, M.H.; Taha, R.A. (2021). High-frequency direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from date palm immature inflorescences using picloram. *J. Genet. Eng. Biotechnol*, **19**, 1–11.

He, C.N.; Ye, W.Q.; Zhu, Y.Y.; Zhou, W.W. (2020). Antifungal activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus methylotrophicus* and *Bacillus thuringiensis* against five common spoilage fungi on loquats. *Molecules*, **25**, 3360.

Houterman, P.M., Cornelissen, B.J. and Rep, M. (2008). Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *PLoS Pathog.* 4, e1000061.

Huang, J., Wei, Z., Tan, S., Mei, X., Yin, S., Shen, Q., & Xu, Y. (2013). The rhizosphere soil of diseased tomato plants as a source for novel microorganisms to control bacterial wilt. *Applied Soil Ecology*, **72**, 79-84.

Huang, X.F., Chaparro, J.M., Reardon, K.F., Zhang, R., Shen, Q., Vivanco, J.M. (2014). Rhizosphere interactions: Root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany*, **92**, 267–275.

Husaini, A. M., Sakina, A., & Cambay, S. R. (2018). Host–pathogen interaction in *Fusarium oxysporum* infections: where do we stand? *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **31**(9), 889-898.

Hussein, F., El Kahtani, M., & Wali, Y. (1979). La culture du palmier et la production de dattes dans le monde arabe et islamique. *Impr. Ain Chamss, Ain Chamss*.

Hwang, S. F., Howard, R. J., Strelkov, S. E., Gossen, B. D., & Peng, G. (2014). Management of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on canola (*Brassica napus*) in western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **36**(sup1), 49-65.

Im, S. M., Yu, N. H., Joen, H. W., Kim, S. O., Park, H. W., Park, A. R., & Kim, J. C. (2020). Biological control of tomato bacterial wilt by oxydifficidin and difficidin-producing *Bacillus methylotrophicus* DR-08. *Pesticide biochemistry and physiology*, **163**, 130-137.

Institut de recherche pour le développement. Collection Colloques et séminaires. Paris, 2010

Iqbal, S., Begum, F., Rabaan, A. A., Aljeldah, M., Al Shammari, B. R., Alawfi, A., ... & Khan, A. (2023). Classification and multifaceted potential of secondary metabolites produced by *Bacillus subtilis* group: a comprehensive review. *Molecules*, **28**(3), 927.

Iqbal, S., Ullah, N., & Janjua, H. A. (2021). In vitro evaluation and genome mining of *Bacillus subtilis* strain RS10 reveals its biocontrol and plant growth-promoting potential. *Agriculture*, **11**(12), 1273.

Jadhav, H. P., Shaikh, S. S., & Sayyed, R. Z. (2017). Role of hydrolytic enzymes of rhizoflora in biocontrol of fungal phytopathogens: an overview. *Rhizotrophs: Plant growth promotion to bioremediation*, 183-203.

Jain, A., Sarsaiya, S., Wu, Q., Lu, Y., Shi, J. (2019). A review of plant leaf fungal diseases and its environment speciation. *Bioengineered*, **10**, 409–424.

Jain, D., Saharan, V., Pareek, S. (2016). Current Status of *Bacillus thuringiensis*: Insecticidal Crystal Proteins and Transgenic Crops. In *Advances in Plant Breeding*

Strategies: Agronomic, Abiotic and Biotic Stress Traits; Springer International Publishing: Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 657–698.

Jaiti, F., Meddich, A., & El Hadrami, I. (2007). Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in the protection of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) against bayoud disease. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **71**(4-6), 166–173.

Jangir, M., Pathak, R., Sharma, S., & Sharma, S. (2018). Biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp., isolated from tomato rhizosphere, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Biological Control*, **123**, 60-70.

Jia, K., Gao, Y. H., Huang, X. Q., Guo, R. J., & Li, S. D. (2015). Rhizosphere inhibition of cucumber *Fusarium* wilt by different surfactin-excreting strains of *Bacillus subtilis*. *The plant pathology journal*, **31**(2), 140.

Jiang, C. H., Liao, M. J., Wang, H. K., Zheng, M. Z., Xu, J. J., & Guo, J. H. (2018). *Bacillus velezensis*, a potential and efficient biocontrol agent in control of pepper gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, **126**, 147-157.

Jiang, C. H., Yao, X. F., Mi, D. D., Li, Z. J., Yang, B. Y., Zheng, Y., ... & Guo, J. H. (2019). Comparative transcriptome analysis reveals the biocontrol mechanism of *Bacillus velezensis* F21 against *Fusarium* wilt on watermelon. *Frontiers in Microbiology*, **10**, 652.

Jiao, X., Takishita, Y., Zhou, G., & Smith, D. L. (2021). Plant associated rhizobacteria for biocontrol and plant growth enhancement. *Frontiers in plant science*, **12**, 634796.

Jin, Y., Zhu, H., Luo, S., Yang, W., Zhang, L., Li, S., ... & Xiao, M. (2019). Role of maize root exudates in promotion of colonization of *Bacillus velezensis* strain S3-1 in rhizosphere soil and root tissue. *Current Microbiology*, **76**(7), 855-862.

Jinal, H. N., Sakthivel, K., & Amaresan, N. (2020). Characterisation of antagonistic *Bacillus paralicheniformis* (strain EAL) by LC–MS, antimicrobial peptide genes, and ISR determinants. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **113**, 1167-1177.

Johnson, D. V., Al-Khayri, J. M., & Jain, S. M. (2015). Introduction: Date production status and prospects in Asia and Europe. *Date Palm Genetic Resources and Utilization: Volume 2: Asia and Europe*, 1-16.

Kaddouri, Y., Abrigach, F., Ouahhoud, S., Benabbes, R., El Kodadi, M., Alsalme, A., Al-Zaqri, N., Warad, I., Touzani, R. (2020). Mono-Alkylated Ligands Based on Pyrazole and Triazole Derivatives Tested Against *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*: Synthesis, Characterization, DFT, and Phytase Binding Site Identification Using Blind Docking/Virtual Screening for Potent Fophy Inhibitors. *Front. Chem*, **8**, 559262.

Kai, M. (2020). Diversity and distribution of volatile secondary metabolites throughout *Bacillus subtilis* isolates. *Frontiers in Microbiology*, **11**, 559.

Karthika, S., Midhun, S. J., & Jisha, M. S. (2020). A potential antifungal and growth promoting bacterium *Bacillus* sp. KTMA4 from tomato rhizosphere. *Microbial pathogenesis*, **142**, 104049.

Kaspar, F., Neubauer, P., & Gimpel, M. (2019). Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: a comprehensive review. *Journal of natural products*, **82**(7), 2038-2053.

Katan, J. (1996). Soil solarization: integrated control aspects. *Principles and Practice of Managing Soilborne Pathogens*. APS Press, St Paul, 250-258.

Katan, T. (1999). Current status of vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytoparasitica*, **27**, 51-64.

Katoh, K., & Toh, H. (2008). Improved accuracy of multiple ncRNA alignment by incorporating structural information into a MAFFT-based framework. *BMC bioinformatics*, **9**(1), 1-13.

Kaur, R., Kaur, J., & Singh, R. S. (2011). Nonpathogenic *Fusarium* as a biological control agent. *Plant Pathology Journal*, **9**(3), 79-91.

Kaur, R., Kaur, S., & Kaur, N. (2021). Phosphate solubilizing bacteria: a neglected bioresource for ameliorating biotic stress in plants. In *Plant-microbe dynamics: recent advances for sustainable agriculture* (pp. 39-50). CRC Press.

Kazerooni, E. A., Maharachchikumbura, S. S., Al-Sadi, A. M., Kang, S. M., Yun, B. W., & Lee, I. J. (2021). Biocontrol Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* against *Botrytis pelargonii* and *Alternaria alternata* on *Capsicum annuum*. *Journal of Fungi*, **7**(6), 472.

Kerbab, S., Silini, A., Chenari Bouket, A., Cherif-Silini, H., Eshelli, M., El Houda Rabhi, N., Belbahri, L. (2021). Mitigation of NaCl stress in wheat by rhizosphere engineering using salt habitat adapted PGPR halotolerant bacteria. *Appl. Sci*, **11**, 1034.

Khadiri, M., Boubaker, H., Askarne, L., Ezrari, S., Radouane, N., Farhaoui, A., ... & Lahlali, R. (2023). *Bacillus cereus* B8W8 an effective bacterial antagonist against major postharvest fungal pathogens of fruit. *Postharvest Biology and Technology*, **200**, 112315.

Khalil, M.M.R., Fierro-Coronado, R.A., Peñuelas-Rubio, O., Villa-Lerma, A.G., Plascencia-Jatomea, R., Félix-Gastélum, R., Maldonado- Mendoza, I.E. (2021). Rhizospheric bacteria as potential biocontrol agents against *Fusarium* wilt and crown and root rot diseases in tomato. *Saudi J. Biol. Sci* **28**, 7460–7471.

Khan, A. R., Mustafa, A., Hyder, S., Valipour, M., Rizvi, Z. F., Gondal, A. S., ... & Daraz, U. (2022). *Bacillus* spp. as bioagents: Uses and application for sustainable agriculture. *Biology*, **11**(12), 1763.

Khan, A., Doshi, H. V., & Thakur, M. C. (2016). *Bacillus* spp.: a prolific siderophore producer. *Bacilli and agrobiotechnology*, 309-323.

Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T. A., Maymon, M., Humm, E. A., Nejat, N., ... & Hirsch, A. M. (2018). Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Frontiers in microbiology*, **9**, 2363.

Khedher, S. B., Mejdoub-Trabelsi, B., & Tounsi, S. (2021). Biological potential of *Bacillus subtilis* V26 for the control of *Fusarium* wilt and tuber dry rot on potato caused by *Fusarium* species and the promotion of plant growth. *Biological Control*, **152**, 104444.

Khene, B., Belghit, S., Mehaya, H., & Attout, F. (2017). Contribution a la recherche d'antagonistes microbiens vis-a-vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* dans les sols de quelques palmeraies du sud algérien (Region de Ghardaïa). *Revue des bio ressources*, **7**(2), 11-11.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol*, **16**, 111–120.

Kistler, H. C. (1997). Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, **87**(4), 474-479.

Kistler, H. C., Bosland, P. W., Benny, U., Leong, S., & Williams, P. H. (1987). Relatedness of strains of *Fusarium oxysporum* from crucifers measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. *Phytopathology*, **77**(9), 1289-1293.

Knudsen, I.M.B.; Hockenhull, J.; Jensen, D.F.; Gerhardson, B.; Hökeberg, M.; Tahvonon, R.; Teperi, E.; Sundheim, L.; Henriksen, B. (1997). Selection of biological control agents for controlling soil and seed-borne diseases in the field. *Eur. J. Plant Pathol*, **103**, 775–784.

Korpi, A., Järnberg, J., & Pasanen, A. L. (2009). Microbial volatile organic compounds. *Critical reviews in toxicology*, **39**(2), 139-193.

Koulla, L et Saaidi, M., (1985). Etude du rôle des inflorescences et de fruits du palmier dattier dans la dissémination du Bayoud. Séminaire National sur l'Agronomie Saharienne. INRA. Marrakech: pp. 67-70.

Kumar, B. P., Trimurtulu, N., Gopal, A. V. (2021). Potential Screening of Indigenous Drought Stress Tolerant Bacteria for Plant Growth Promotion (PGP) Traits: An In-vitro Study. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry*, **22**(3), 8-21.

Kumar, D.; Kumar, L.; Nagar, S.; Raina, C.; Parshad, R.; Gupta, V.K. (2012). Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. *Arch. Appl. Sci. Res*, **4**, 1763–1770.

Kumar, K., N. Amaresan, K. Madhuri, R.K. Gautam and R.C. Srivasatava. (2011). “Isolation and characterization of plant growth promoting bacteria and their effect on chilli (*Capsicum annum*) seedling growth”. Proceedings of the 2nd Asian PGPR Conference August 21-24, 2011, Beijing, P.R. China. p 93-101.

Kumar, P., Dubey, R.C., Maheshwari, D.K. (2012). *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiol. Res*, **167**, 493–499.

- Lajis, A. F. B. (2020).** Biomanufacturing process for the production of bacteriocins from Bacillaceae family. *Bioresources and Bioprocessing*, **7**, 1-26.
- Lamari, L., Bouras, N., Boudjella, H., Ould EL Hadj-Khelil, A., Ould El Hadj, M.D., Sabaou, N. (2014).** Influence de quelques souches bactériennes d'origine saharienne sur l'expression de la fusariose du lin et du palmier dattier. *Algerian J. Arid Environ*, **4**, 65–77.
- Lastochkina, O., Baymiev, A., Shayahmetova, A., Garshina, D., Koryakov, I., Shpirnaya, I., ... & Palamutoglu, R. (2020).** Effects of endophytic *Bacillus subtilis* and salicylic acid on postharvest diseases (*Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum*) development in stored potato tubers. *Plants*, **9**(1), 76.
- Latha, P., Karthikeyan, M., & Rajeswari, E. (2019).** Endophytic bacteria: prospects and applications for the plant disease management. *Plant Health Under Biotic Stress: Volume 2: Microbial Interactions*, 1-50.
- Lemanceau, P., Blouin, M., Muller, D., & Moëgne-Loccoz, Y. (2017).** Let the core microbiota be functional. *Trends in Plant Science*, **22**(7), 583-595.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006).** *Fusarium* laboratory workshops—A recent history. *Mycotoxin Research*, **22**(2), 73-74.
- Li, X., Wang, X., Shi, X., Wang, B., Li, M., Wang, Q., & Zhang, S. (2020).** Antifungal effect of volatile organic compounds from *Bacillus velezensis* CT32 against *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum*. *Processes*, **8**(12), 1674.
- Lim, S. M., Yoon, M. Y., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Shin, T. S., ... & Kim, J. C. (2017).** Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. *The plant pathology journal*, **33**(5), 488.
- Liu, C., Yin, X., Wang, Q., Peng, Y., Ma, Y., Liu, P., & Shi, J. (2018).** Antagonistic activities of volatiles produced by two *Bacillus* strains against *Monilinia fructicola* in peach fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **98**(15), 5756-5763.
- Loper, J.E., & Schroth, M.N. (1986).** Influence of bacterial sources of indole- 3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology*, **76**, 386–389. <https://doi.org/10.1094/Phyto-76-386>.
- Lorck, H. (1948).** Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiol. Plant* **1**, 142–146.
- Louvet J, Bulit J, Toutain G, Rieuf P (1970).** Le Bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier, symptômes et nature de la maladie, moyens de lutte. *Al-Awamia*, **35**: 161-182.
- Luchi, N., Ghelardini, L.; Belbahri, L.; Quartier, M.; Santini, A. (2013).** Rapid detection of *Ceratocystis platani* inoculum by quantitative Real-Time PCR assay. *Appl. Environ. Microbiol*, **79**, 5394–5404.
- Luo, C., Liu, X., Zhou, H., Wang, X., & Chen, Z. (2015).** Nonribosomal peptide synthase gene clusters for lipopeptide biosynthesis in *Bacillus subtilis* 916 and their phenotypic functions. *Applied and environmental microbiology*, **81**(1), 422-431.

- Luo, L., Zhao, C., Wang, E., Raza, A., & Yin, C. (2022).** *Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview for its mechanisms. *Microbiological Research*, **259**, 127016.
- Madhava Rao, K. V., & Sresty, T. V. S. (2000).** Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant science*, **157**(1), 113-128.
- Majeed, A., Muhammad, Z., & Ahmad, H. (2018).** Plant growth promoting bacteria: role in soil improvement, abiotic and biotic stress management of crops. *Plant cell reports*, **37**, 1599-1609.
- Marschner, P., Crowley, D., & Yang, C. H. (2004).** Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and soil*, **261**(1-2), 199-208.
- Maslouhy, A. (1989).** Contribution à l'étude *in vitro* et *in situ* des antagonistes de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* agent causal du Bayoud. Thèse de troisième cycle, Université Cadi Ayyad, Marrakech, p. 98.
- Mawarda, P. C., Mallon, C. A., Le Roux, X., van Elsas, J. D., & Salles, J. F. (2022).** Interactions between Bacterial Inoculants and Native Soil Bacterial Community: the Case of Spore-forming *Bacillus* spp. *FEMS microbiology ecology*, **98**(12), fiac127.
- McDonald, B. R., & Currie, C. R. (2017).** Lateral gene transfer dynamics in the ancient bacterial genus *Streptomyces*. *MBio*, **8**(3), 10-1128.
- Meena, M., Swapnil, P., Zehra, A., Aamir, M., Dubey, M. K., Goutam, J., & Upadhyay, R. S. (2017).** Beneficial microbes for disease suppression and plant growth promotion. *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives: Volume 2: Microbial Interactions and Agro-Ecological Impacts*, 395-432.
- Mefteh, F.B., Chenari Bouket, A., Daoud, A., Luptakova, L., Alenezi, F.N., Gharsallah, N., Belbahri, L. (2019).** Metagenomic insights and genomic analysis of *phosphogypsum* and its associated plant endophytic microbiomes reveals valuable actors for waste bioremediation. *Microorganisms*, **7**, 382.
- Mes, J. J., Van Doorn, J., Roebroek, E. J. A., Van Egmond, E., Van Aartrijk, J., & Boonekamp, P. M. (1994).** Restriction fragment length polymorphisms, races and vegetative compatibility groups within a worldwide collection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. *Plant Pathology*, **43**(2), 362-370.
- Michielse, C.B., & Rep, M. (2009).** Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 311-324.
- Mihalache, G., Balaes, T., Gostin, I., Stefan, M., Coutte, F., & Krier, F. (2018).** Lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* as new biocontrol products against fusariosis in ornamental plants. *Environmental Science and Pollution Research*, **25**, 29784-29793.

- Miljaković, D., Marinković, J., & Balešević-Tubić, S. (2020).** The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms*, **8**(7), 1037.
- Moragrega, C., Carmona, A., & Llorente, I. (2021).** Biocontrol of *Stemphylium vesicarium* and *Pleospora allii* on pear by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma* spp.: Preventative and curative effects on inoculum production. *Agronomy*, **11**(8), 1455.
- Morales-Cedeno, L.R., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Loeza-Lara, P.D., Parra-Cota, F.I., de Los Santos-Villalobos, S., Santoyo, G. (2021).** Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre-and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. *Microbiol. Res*, **242**, 126612.
- Morita, T., Tanaka, I., Ryuda, N., Ikari, M., Ueno, D., Someya, T. (2019).** Antifungal spectrum characterization and identification of strong volatile organic compounds produced by *Bacillus pumilus* TM-R. *Heliyon*, **5**, e01817.
- Moulay, L. (1995).** Contribution à l'étude technico-économique de la filière "Datte" en Algérie. Cas de la wilaya de Ouargla. Thèse Ing., d'état, I.N.A., Alger. p.157
- Mouloud, G., Samir, M., Laid, B., & Daoud, H. (2017).** Isolation and characterization of rhizospheric *Streptomyces* spp. for the biocontrol of *Fusarium* wilt (bayoud) disease of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *J. Sci. Agric*, **1**, 132-145.
- Mukherjee, A., Chouhan, G. K., Gaurav, A. K., Jaiswal, D. K., & Verma, J. P. (2021).** Development of indigenous microbial consortium for biocontrol management. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 91-104). Elsevier.
- Müller, S., Strack, S. N., Ryan, S. E., Kearns, D. B., & Kirby, J. R. (2015).** Predation by *Myxococcus xanthus* induces *Bacillus subtilis* to form spore-filled megastructures. *Applied and environmental microbiology*, **81**(1), 203-210.
- Muniroh, M.S., Nusaibah, S.A., Vadamalai, G., Siddique, Y. (2019).** Proficiency of biocontrol agents as plant growth promoters and hydrolytic enzyme producers in *Ganoderma boninense* infected oil palm seedlings. *Curr. Plant Biol*, **20**, 100116.
- Nazli, F., Mustafa, A., Ahmad, M., Hussain, A., Jamil, M., Wang, X., Shakeel, Q., Imtiaz, M., El-Esawi, M.A. (2020).** A review on practical application and potentials of phytohormone-producing plant growth-promoting rhizobacteria for inducing heavy metal tolerance in crops. *Sustainability*, **12**, 9056.
- Ngo, T.T., Dart, P., Callaghan, M., Klieve, A., McNeill, D. (2021).** Volatile Organic Compound Profiles Associated with Microbial Development in Feedlot Pellets Inoculated with *Bacillus amyloliquefaciens* H57 Probiotic. *Animals*, **11**, 3227.
- Nishad, R., & Ahmed, T.A. (2020).** Survey and identification of date palm pathogens and indigenous biocontrol agents. *Plant Dis*, **104**, 2498–2508.

Niu, B., Wang, W., Yuan, Z., Sederoff, R. R., Sederoff, H., Chiang, V. L., & Borriss, R. (2020). Microbial interactions within multiple-strain biological control agents impact soil-borne plant disease. *Frontiers in Microbiology*, **11**, 585404.

Niu, D., Wang, X., Wang, Y., Song, X., Wang, J., Guo, J., Zhao, H. (2016). *Bacillus cereus* AR156 activates PAMP-triggered immunity and induces a systemic acquired resistance through a NPR1 -and SA-dependent signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **469**, 120–125.

Noman, M., Ahmed, T., Ijaz, U., Shahid, M., Azizullah, Li, D., ... & Song, F. (2021). Plant–Microbiome crosstalk: Dawning from composition and assembly of microbial community to improvement of disease resilience in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**(13), 6852.

OEPP/EPP. (1982). Fiches informatives sur les organismes de quarantaine n 70, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Bulletin* 1982, **12**. <https://gd.eppo.int/taxon/FUSAAL/datasheet> (accessed on 6 December 2017).

OEPP/EPP. (1994). *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. Data Sheets on Quarantine Pests, See IMI, No. 240.

OEPP/EPO. (1990). Specific quarantine requirements. *EPPO Technical Documents* No. 1008.

Oihabi, A., Hatimi, A., & Amir, H. (1992). Etude de la réceptivité au Bayoud de deux sols de palmeraies marocaines. *Phytopathologia Mediterranea*, 19-27.

Olsen, R.S., Sommers, L.E. (1982). Phosphorus. In *Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Properties*, 2nd Ed.; Pages, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R., Eds. American Society of Agronomy: Madison, WI, USA, pp. 403–430.

Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology*, **16**(3), 115-125.

Oubraim, S., Sedra, M. H., Lazrek, H. B. (2016). A relationship between Bayoud disease severity and toxin susceptibility of date palm cultivars. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, **28**(1): 45-51.

Palmieri, D., Vitullo, D., De Curtis, F., & Lima, G. (2017). A microbial consortium in the rhizosphere as a new biocontrol approach against *Fusarium* decline of chickpea. *Plant and soil*, **412**, 425-439.

Palou, L., Rosales, R., Taberner, V., & Vilella-Espla, J. (2016). Incidence and etiology of postharvest diseases of fresh fruit of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in the grove of Elx (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*, 391-400.

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

Pellegrini, M., Pagnani, G., Bernardi, M., Mattedi, A., Spera, D. M., & Gallo, M. D. (2020). Cell-free supernatants of plant growth-promoting bacteria: A review of their use as biostimulant and microbial biocontrol agents in sustainable agriculture. *Sustainability*, **12**(23), 9917.

Pereau-Leroy P (1958). Le palmier dattier au Maroc, ministère de l'Agriculture, Service de la recherche agronomique, Maroc et Institut de recherche fruitière outre-mer, Institut des fruits et agrumes coloniaux, Paris, pp. 142.

Perez-Nadales, E., Nogueira, M. F. A., Baldin, C., Castanheira, S., El Ghalid, M., Grund, E., ... & Wendland, J. (2014). Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal genetics and biology*, **70**, 42-67.

Planas, A. (2000). Bacterial 1, 3-1, 4- β -glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1543**(2), 361-382.

Pliego, C., Ramos, C., de Vicente, A., Cazorla, F.M. (2011). Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant Soil*, **340**, 505–520.

Posada, L.F., Álvarez, J.C., Romero-Tabarez, M., de-Bashan, L., Villegas-Escobar, V. (2018). Enhanced molecular visualization of root colonization and growth promotion by *Bacillus subtilis* EA-CB0575 in different growth systems. *Microbiol. Res*, **217**, 69–80.

Poulaki, E. G., & Tjamos, S. E. (2023). *Bacillus* species: factories of plant protective volatile organic compounds. *Journal of Applied Microbiology*, **134**(3), 1xad037.

Praveen Kumar, G., Mir Hassan Ahmed, S.K., Desai, S., Leo Daniel Amalraj, E., Rasul, A. (2014). In vitro screening for abiotic stress tolerance in potent biocontrol and plant growth promoting strains of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. *Int. J. Bacteriol*, **2014**, 195946.

Putri, R.E., Mubarik, N.R., Ambarsari, L., Wahyudi, A.T. (2021). Antagonistic activity of glucanolytic bacteria *Bacillus subtilis* W3. 15 against *Fusarium oxysporum* and its enzyme characterization. *Biodiversitas J. Biol. Divers*, **22**, 4067–4077.

Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS microbiology reviews*, **34**(6), 1037-1062.

Rabbee, M. F., Hwang, B. S., & Baek, K. H. (2023). *Bacillus velezensis*: A Beneficial Biocontrol Agent or Facultative Phytopathogen for Sustainable Agriculture. *Agronomy*, **13**(3), 840.

Rabhi, N. E. H., Cherif-Silini, H., Silini, A., Alenezi, F. N., Chenari Bouket, A., Oszako, T., & Belbahri, L. (2022). Alleviation of Salt Stress via Habitat-Adapted Symbiosis. *Forests*, **13**(4), 586.

Rabhi, N. E. H., Silini, A., Cherif-Silini, H., Yahiaoui, B., Lekired, A., Robineau, M., ... & Sanchez, L. (2018). *Pseudomonas knackmussii* MLR6, a rhizospheric strain isolated from halophyte, enhances salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Applied Microbiology*, **125**(6), 1836-1851.

Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd_Allah, E. F. (2017). *Bacillus*: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. *Frontiers in physiology*, **8**, 667.

Ramakrishna, W., Rathore, P., Kumari, R., Yadav, R. (2020). Brown gold of marginal soil: Plant growth promoting bacteria to overcome plant abiotic stress for agriculture, biofuels and carbon sequestration. *Sci. Total Environ*, **711**, 135062.

Ramírez, V., Martínez, J., Bustillos-Cristales, M. D. R., Catañeda-Antonio, D., Munive, J. A., & Baez, A. (2022). *Bacillus cereus* MH778713 elicits tomato plant protection against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Applied Microbiology*, **132**(1), 470-482.

Ray, S., Mishra, S., Bisen, K., Singh, S., Sarma, B. K., & Singh, H. B. (2018). Modulation in phenolic root exudate profile of *Abelmoschus esculentus* expressing activation of defense pathway. *Microbiological research*, **207**, 100-107.

Raymaekers, K., Ponet, L., Holtappels, D., Berckmans, B., & Cammue, B. P. (2020). Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management—a review. *Biological Control*, **144**, 104240.

Raza, W., Wang, J., Wu, Y., Ling, N., Wei, Z., Huang, Q., Shen, Q. (2016). Effects of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth and virulence traits of tomato bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 7639–7650.

Rekik, I., Chaabane, Z., Missaoui, A., Bouket, A. C., Luptakova, L., Elleuch, A., & Belbahri, L. (2017). Effects of untreated and treated wastewater at the morphological, physiological and biochemical levels on seed germination and development of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), alfalfa (*Medicago sativa* L.) and fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Journal of hazardous materials*, **326**, 165-176.

Rispail, N., & Di Pietro, A. (2010). The two-component histidine kinase Fhk1 controls stress adaptation and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology*, **11**(3), 395-407.

Roesti, D., Gaur, R., Johri, B. N., Imfeld, G., Sharma, S., Kawaljeet, K., & Aragno, M. (2006). Plant growth stage, fertiliser management and bio-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat fields. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**(5), 1111-1120.

Rojas-Solís, D., Hernández-Pacheco, C. E., & Santoyo, G. (2016). Evaluation of *Bacillus* and *Pseudomonas* to colonize the rhizosphere and their effect on growth

promotion in tomato (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.). *Revista Chapingo. Serie horticultura*, **22**(1), 45-58.

Rosier, A., Medeiros, F. H., & Bais, H. P. (2018). Defining plant growth promoting rhizobacteria molecular and biochemical networks in beneficial plant-microbe interactions. *Plant and Soil*, **428**, 35-55.

Ruano-Rosa, D., Cazorla, F. M., Bonilla, N., Martín-Pérez, R., De Vicente, A., & López-Herrera, C. J. (2014). Biological control of avocado white root rot with combined applications of *Trichoderma* spp. and rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, **138**, 751-762.

Saadaoui, N., Silini, A., Cherif-Silini, H., Bouket, A. C., Alenezi, F. N., Luptakova, L., ... & Belbahri, L. (2022). Semi-Arid-Habitat-Adapted Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria Allows Efficient Wheat Growth Promotion. *Agronomy*, **12**(9), 2221.

Saaidi, M. (1990). Amélioration génétique du palmier dattier : critères de sélection, techniques et résultats. *Options Méditerranéennes*, **11**, 133-134.

Saeed, E. E., Sham, A., El-Tarabily, K., Abu Elsamem, F., Iratni, R., & AbuQamar, S. F. (2016). Chemical control of black scorch disease on date palm caused by the fungal pathogen *Thielaviopsis punctulata* in United Arab Emirates. *Plant disease*, **100**(12), 2370-2376.

Saeed, E. E., Sham, A., Salmin, Z., Abdelmowla, Y., Iratni, R., El-Tarabily, K., & AbuQamar, S. (2017). *Streptomyces globosus* UAE1, a potential effective biocontrol agent for black scorch disease in date palm plantations. *Frontiers in Microbiology*, **8**, 1455.

Saggai, M. M. (2001). Effet de trois degrés de ciselage combiné et de deux types de pollen sur la production dattier chez deux cultivars Ghars et Deglet –Nour dans la région de Ouargla. Mémoire d'Ing INFS/AS, Ouargla .pp.15-24.

Sahu, P. K., Jayalakshmi, K., Tilgam, J., Gupta, A., Nagaraju, Y., Kumar, A., ... & Rajawat, M. V. S. (2022). ROS generated from biotic stress: Effects on plants and alleviation by endophytic microbes. *Frontiers in Plant Science*, **13**.

Saidi, S., Cherif-Silini, H., Chenari Bouket, A., Silini, A., Eshelli, M., Luptakova, L., ... & Belbahri, L. (2021). Improvement of Medicago sativa crops productivity by the co-inoculation of *Sinorhizobium meliloti*–actinobacteria under salt stress. *Current microbiology*, **78**, 1344-1357.

Samaras, A., Roumeliotis, E., Ntasiou, P., & Karaoglanidis, G. (2021). *Bacillus subtilis* MBI600 promotes growth of tomato plants and induces systemic resistance contributing to the control of soilborne pathogens. *Plants*, **10**(6), 1113.

Sansinenea, E., & Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology letters*, **33**, 1523-1538.

Santhanam, R., Menezes, R.C., Grabe, V., Li, D., Baldwin, I.T., Groten, K. (2019). A suite of complementary biocontrol traits allows a native consortium of root-associated

bacteria to protect their host plant from a fungal sudden-wilt disease. *Mol. Ecol*, **28**, 1154–1169.

Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., and Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat. Ecol. Evol.* **3**, 430–439.

Saxena, A. K., Kumar, M., Chakdar, H., Anuroopa, N., & Bagyaraj, D. J. (2020). *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of applied microbiology*, **128**(6), 1583-1594.

Schwyn, B., Neilands, J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem*, **160**, 47–56.

Secaira-Morocho, H., Castillo, J. A., & Driks, A. (2020). Diversity and evolutionary dynamics of spore-coat proteins in spore-forming species of Bacillales. *Microbial genomics*, **6**(11).

Sedra MH. (2005). Caractérisation des clones sélectionnés du palmier dattier pour combattre la maladie du Bayoud. Erfoud-Maroc : Actes du symposium international sur : le développement durable des systèmes oasiens, pp. 72–79.

Sedra, M. H. (2003). Le Bayoud du palmier dattier en Afrique du Nord, Ed FAO. 125p.

Sedra, M. H., & Rouxel, F. (1989). Resistance des sols aux maladies : mise en évidence de la résistance d'un sol de la palmeraie de Marrakech aux fusarioses vasculaires.

Sedra, M. H., Djerbi, M., Chadli, F., & Assari, K. (1985). Mise au point d'une méthode rapide et précise d'identification *in vitro* du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albenidis*, agent causal du Bayoud. In *Annales de l'Institut national de la recherche agronomique de Tunisie* (Vol. **58**, pp. 1-12).

Sedra, M., & Lazrek, B. H. (2011). *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* toxin characterization and use for selection of resistant date palm to Bayoud disease. *Date palm biotechnology*, 253-270.

Sedra, M.H. (2005). *La Maladie du Bayoud du Palmier Dattier en Afrique du Nord: Diagnostic et Caractérisation*; Actes du Symposium International sur le Développement durable des Systèmes Oasiens: Erfoud, Marocco.

Sedra, MyH (1994). Mise au point d'une méthode pour l'évaluation rapide de la résistance au bayoud des plantules du palmier dattier issues de semis. *Al-Awamia*, **86**, 21-41.

Segorbe, D., Di Pietro, A., Pérez-Nadales, E., & Turrà, D. (2017). Three *Fusarium oxysporum* mitogen-activated protein kinases (MAPKs) have distinct and complementary roles in stress adaptation and cross-kingdom pathogenicity. *Molecular Plant Pathology*, **18**(7), 912-924.

Seo, D. J., Lee, J. H., Song, Y. S., Park, R. D., & Jung, W. J. (2014). Expression patterns of chitinase and chitosanase produced from *Bacillus cereus* in suppression of phytopathogen. *Microbial pathogenesis*, **73**, 31-36.

Sghir, F., Touati, J., Mouria, B., Touhami, A. O., Filali-Maltouf, A., El Modafar, C., ... & Douira, A. (2016). Variation in pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* on two cultures associated with date palm of Moroccan oasis. *World Journal of Pharmaceutical and Life Sciences*, **2**(3), 56-68.

Shafi, J., Tian, H., & Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **31**(3), 446-459.

Shao, J., Liu, Y., Xie, J., Stefanic, P., Lv, Y., Fan, B., Mandic-Mulec, I., Zhang, R., Shen, Q., Xu, Z. (2022). Annulment of Bacterial Antagonism Improves Plant Beneficial Activity of a *Bacillus velezensis* Consortium. *Appl. Environ. Microbiol*, **88**, e0024022.

Shi, L., Du, N., Yuan, Y., Shu, S., Sun, J., & Guo, S. (2016). Vinegar residue compost as a growth substrate enhances cucumber resistance against the *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* by regulating physiological and biochemical responses. *Environmental Science and Pollution Research*, **23**, 18277-18287.

Sidky, R. (2017). Optimized direct organogenesis from shoot tip explants of date palm. In *Date Palm Biotechnology Protocols*; Humana Press: New York, NY, USA, Volume **1**, pp. 37-45.

Silini, A., Cherif-Silini, H., Yahiaoui, B. (2016). Growing varieties durum wheat (*Triticum durum*) in response to the effect of osmolytes and inoculation by *Azotobacter chroococcum* under salt stress. *Afr. J. Microbiol. Res*, **10**, 387-399.

Silini-Cherif, H., Silini, A., Ghoul, M., Yadav, S. (2012). Isolation and characterization of plant growth promoting traits of a rhizobacteria: *Pantoea agglomerans* lma2. *Pakistan J. Biol. Sci. PJBS*, **15**, 267-276.

Simbaqueba, J., Catanzariti, A. M., González, C., & Jones, D. A. (2018). Evidence for horizontal gene transfer and separation of effector recognition from effector function revealed by analysis of effector genes shared between cape gooseberry-and tomato-infecting formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, **19**(10), 2302-2318.

Singh UB, Malvivya D, Wasiullah, Singh S, Imran M, Pathak N, Alam M, Rai JP, Singh RK, Sarma Bk, Sharma PK and Sharma AK. (2016). Compatible salt-tolerant rhizosphere microbe-mediated induction of phenylpropanoid cascade and induced systemic responses against *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker causing spot blotch disease in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied Soil Ecology*: **108**:300-306.

Singh, G., & Pujari, M. (2022). *Bacillus subtilis* as a plant-growth-promoting rhizobacteria: A REVIEW. *Plant Archives (09725210)*, **22**(2).

Singh, M., Singh, D., Gupta, A., Pandey, K. D., Singh, P. K., & Kumar, A. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria: application in biofertilizers and biocontrol of

phytopathogens. In *PGPR amelioration in sustainable agriculture* (pp. 41-66). Woodhead Publishing.

Slama, H.B., Cherif-Silini, H., Chenari Bouket, A., Qader, M., Silini, A., Yahiaoui, B.; Alenezi, F.N.; Luptakova, L.; Triki, M.A.; Vallat, A.; et al. (2019). Screening for *Fusarium* antagonistic bacteria from contrasting niches designated the endophyte *Bacillus halotolerans* as plant warden against *Fusarium*. *Front. Microbiol*, **9**, 3236.

Soudani, A. (2015). Essai de lutte biologique *in vitro* et *in vivo* contre la fusariose vasculaire (cas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* et *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*). Master sciences agro.Phytopharmacie et Gestion des Risques Phytosanitaires.univ. de Mascara.

Stenberg, J. A., Sundh, I., Becher, P. G., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P. A., ... & Viketoft, M. (2021). When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science*, **94**(3), 665-676.

Suleman, P., Al-Musallam, A., & Menezes, C. A. (2002). The effect of biofungicide Mycostop on *Ceratocystis radicola*, the causal agent of black scorch on date palm. *BioControl*, **47**, 207-216.

Synder, W. C., & Hansen, H. N. (1940). The species concept in *Fusarium*. *Amer. J. Bot.*, **27**, 64-67.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725– 2729.

Tantaoui, A., & Fernandez, D. (1993). Comparaison entre *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et *Fusarium oxysporum* des sols de palmeraies par l'étude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP). *Phytopathologia mediterranea*, 235-244.

Taylor, J. W., Jacobson, D. J., & Fisher, M. C. (1999). The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. *Annual review of phytopathology*, **37**(1), 197-246.

Thomloui, E. E., Tsalgatidou, P. C., Douka, D., Spantidos, T. N., Dimou, M., Venieraki, A., & Katinakis, P. (2019). Multi strain versus single-strain plant growth promoting microbial inoculants-The compatibility issue. *Hellenic Plant Protection Journal*, **12**(2), 61-77.

Timm, C. M., Pelletier, D. A., Jawdy, S. S., Gunter, L. E., Henning, J. A., Engle, N., ... & Weston, D. J. (2016). Two poplar-associated bacterial isolates induce additive favorable responses in a constructed plant-microbiome system. *Frontiers in plant science*, **7**, 497.

Toral, L., Rodríguez, M., Martínez-Checa, F., Montaña, A., Cortés-Delgado, A., Smolinska, A., ... & Sampedro, I. (2021). Identification of volatile organic compounds in extremophilic bacteria and their effective use in biocontrol of postharvest fungal phytopathogens. *Frontiers in microbiology*, **12**, 773092.

- Tran, D.M., Huynh, T.U., Nguyen, T.H., Do, T.O., Pentekhina, I., Nguyen, Q.V., Nguyen, A.D. (2022).** Expression, purification, and basic properties of a novel domain structure possessing chitinase from *Escherichia coli* carrying the family 18 chitinase gene of *Bacillus velezensis* strain RB.IBE29. *Mol. Biol. Rep*, **49**, 4141–4148.
- Triky-Dotan, S., Austerweil, M., Steiner, B., Peretz-Alon, Y., Katan, J., & Gamliel, A. (2007).** Generation and dissipation of methyl isothiocyanate in soils following metam sodium fumigation: impact on *Verticillium* control and potato yield. *Plant disease*, **91**(5), 497-503.
- Vannier, N., Agler, M., & Hacquard, S. (2019).** Microbiota-mediated disease resistance in plants. *PLoS pathogens*, **15**(6), e1007740.
- Verma, M., Mishra, J., & Arora, N. K. (2019).** Plant growth-promoting rhizobacteria: diversity and applications. *Environmental biotechnology: for sustainable future*, 129-173.
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & Santos-Villalobos, S. D. L. (2018).** The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista mexicana de fitopatología*, **36**(1), 95-130
- Vinayarani, G., & Prakash, H. (2018).** Growth promoting rhizospheric and endophytic bacteria from *Curcuma longa* L. as biocontrol agents against rhizome rot and leaf blight diseases. *Plant Pathol. J*, **34**, 218.
- Wan, Y., Stanovych, A., Gori, D., Zirah, S., Kouklovsky, C., & Alezra, V. (2018).** β , γ diamino acids as building blocks for new analogues of Gramicidin S: Synthesis and biological activity. *European journal of medicinal chemistry*, **149**, 122-128.
- Wang, H., Liu, R., You, M. P., Barbetti, M. J., & Chen, Y. (2021).** Pathogen biocontrol using plant growth-promoting bacteria (PGPR): Role of bacterial diversity. *Microorganisms*, **9**(9), 1988.
- Wang, H., Wang, Z., Liu, Z., Wang, K., & Xu, W. (2021).** Membrane disruption of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* induced by myriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* LZN01. *Microbial Biotechnology*, **14**(2), 517-534.
- Wang, T., Liang, Y., Wu, M., Chen, Z., Lin, J., & Yang, L. (2015).** Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, **23**(4), 744-754.
- Wang, X. Q., Zhao, D. L., Shen, L. L., Jing, C. L., & Zhang, C. S. (2018).** Application and mechanisms of *Bacillus subtilis* in biological control of plant disease. In *Role of rhizospheric microbes in soil* (pp. 225-250). Springer, Singapore.
- Watson, A.G. (1974).** Pathogenicity test for identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. Bulletin d'Agronomie Saharienne **1**, 37-38.
- Wollenweber, H. W., & Reinking, O. A. (1935).** Die fusarien: ihre beschreibung, schadwirkung und bekämpfung. (*No Title*).

- Woloshuk, C. P., & Kolattukudy, P. E. (1986).** Mechanism by which contact with plant cuticle triggers cutinase gene expression in the spores of *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **83**(6), 1704-1708.
- Wu, L., Huang, Z., Li, X., Ma, L., Gu, Q., Wu, H., Liu, J., Borriss, R., Wu, Z., Gao, X. (2018).** Stomatal closure and SA-, JA/ET-signaling pathways are essential for *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 to restrict leaf disease caused by *Phytophthora nicotianae* in *Nicotiana benthamiana*. *Front Microbiol* **9**, 847.
- Wu, Y., Zhou, J., Li, C., & Ma, Y. (2019).** Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbiology Open*, **8**(8), e00813.
- Xie, H., Yan, D., Mao, L., Wang, Q., Li, Y., Ouyang, C., ... & Cao, A. (2015).** Evaluation of methyl bromide alternatives efficacy against soil-borne pathogens, nematodes and soil microbial community. *PloS one*, **10**(2), e0117980.
- Xu, W., Yang, Q., Yang, F., Xie, X., Goodwin, P. H., Deng, X., ... & Yang, L. (2022).** Evaluation and genome analysis of *Bacillus subtilis* YB-04 as a potential biocontrol agent against *Fusarium* wilt and growth promotion agent of Cucumber. *Frontiers in Microbiology*, **13**.
- Yang, Y., Huang, P., Ma, Y., Jiang, R., Jiang, C., & Wang, G. (2022).** Insights into intracellular signaling network in *Fusarium* species. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Yi, H.-S., Ahn, Y.-R., Song, G.C., Ghim, S.-Y., Lee, S., Lee, G., Ryu, C.-M. (2016).** Impact of a Bacterial Volatile 2,3-Butanediol on *Bacillus subtilis* Rhizosphere Robustness. *Front. Microbiol*, **7**, 993.
- Yu, X., Ai, C., Xin, L., & Zhou, G. (2011).** The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, **47**(2), 138-145.
- Yu, X., Li, Y., Zhang, C., Liu, H., Liu, J., Zheng, W., Kang, X., Leng, X., Zhao, K., Gu, Y. (2014).** Culturable heavy metal-resistant and plant growth promoting bacteria in V-Ti magnetite mine tailing soil from Panzhihua, China. *PLoS ONE*, **9**, e106618.
- Yu, Y., Gui, Y., Li, Z., Jiang, C., Guo, J., & Niu, D. (2022).** Induced systemic resistance for improving plant immunity by beneficial microbes. *Plants*, **11**(3), 386.
- Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., Huang, Q. (2012).** Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Appl. Environ. Microbiol*, **78**, 5942–5944.
- Zaid A. (2002).** *Date palm cultivation*. Food and agricultural organization of the United Nations, Rome, (en ligne) URL : <http://www.fao.org/docrep/006/y4360e/y4360e00.htm>.

Zaid A., Wet P.F., Djerbi M and Oihabi A.C. (2002). Diseases and pests of date palm. In Date Palm Cltivation. FAO plant production and protection paper 156. Ed. Zaid A. and Arias-Jimenez E. PP 227-281.

Zaid, A., Arias, E. J., & Taher, F. (2002). Date Palm Global Network. Project Document.
Zakaria, M. A. T., Sakimin, S. Z., Ismail, M. R., Ahmad, K., Kasim, S., & Baghdadi, A. (2023). Biostimulant Activity of Silicate Compounds and Antagonistic Bacteria on Physiological Growth Enhancement and Resistance of Banana to *Fusarium* Wilt Disease. *Plants*, **12**(5), 1124.

Zhang, B., Dong, C., Shang, Q., Han, Y., & Li, P. (2013). New insights into membrane-active action in plasma membrane of fungal hyphae by the lipopeptide antibiotic bacillomycin L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1828**(9), 2230-2237.

Zhang, D., Yu, S., Yang, Y., Zhang, J., Zhao, D., Pan, Y., ... & Zhu, J. (2020). Antifungal effects of volatiles produced by *Bacillus subtilis* against *Alternaria solani* in potato. *Frontiers in Microbiology*, **11**, 1196.

Zhao, P., Quan, C., Wang, Y., Wang, J., & Fan, S. (2014). *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. *Journal of basic microbiology*, **54**(5), 448-456.

Ziedan, E. S. H., Farrag, E. S., & Sahab, A. F. (2013). First record and preliminary evaluation of *Mucor hiemalis* as biocontrol agent on inflorescence brown rot incidence of date palm. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, **46**(5), 617-626.

Ziouti, A., El Modafar, C., El Mandili, A., El Boustani, E., & Macheix, J. J. (1996). Identification des acides caféoylshikimiques des racines du palmier dattier, principaux composés fongitoxiques vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Journal of Phytopathology*, **144**(4), 197-202.

Zuo, Y., & Zhang, F. (2011). Soil and crop management strategies to prevent iron deficiency in crops. *Plant and Soil*, **339**, 83-95.

Zuriegat, Q., Zheng, Y., Liu, H., Wang, Z., & Yun, Y. (2021). Current progress on pathogenicity-related transcription factors in *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, **22**(7), 882-895.

Annexes

Annexe 1 : Trypticase Soja Agar (TSA)

Peptone tryptique de caséine	17g
Peptone papainique de soja	5g
NaCl	5g
K ₂ HPO ₄	2,5g
Glucose	5g
Agar-agar	12g
Eau distillée	1000ml

Annexe 2 : Milieu de King B (Flucka)

Peptone de caséine	10g
Glycérol	10ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5g
K ₂ HPO ₄	1,5g
Agar agar	12g
Eau distillée	1000 ml

Annexe 3 : Gélose YMA (Yeast Malt Agar)

Extrait de levure	4g
Extrait de malt	10g
Glucose	4g
CaCO ₃	2g
Agar-agar	12g
Eau distillée	1000 ml

Annexe 4 : Gélose PDA (Potato Dextrose Agar)

Extrait de pomme de terre	200g
Glucose	20g
Agar-agar	15g
Eau distillée	1000ml
pH du milieu prêt à l'emploi à 37°C	5.6 ± 0.2

Annexe 5 : Bouillon LB (Luria-Bertani)

Tryptone	10g
Extrait de levure	5g
Chlorure de sodium	5g
Eau distillée	1000ml
pH final à 25°C	7

Annexe 6 : Bouillon TSB (Tryptic Soy Broth)

Tryptone:	17g
Peptone papainique de soja:	3g
Glucose:	2.5g
Phosphate dipotassique:	2.5g
Chlorure de sodium:	5.0g
Eau distillée	1000ml
pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C	7.3 ± 0.2

Annexe 7 : Milieu Pikovskaya PVK (solubilisation du phosphate)

D – Glucose	10g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5g
NaCl	0.2g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.1g
KCl	0.2g
Extrait de levure	0,5g
MnSO ₄ . 5H ₂ O	0.002g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.002g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5g
Eau distillée q. s. p	1000ml

Annexe 8 : Milieu Winogradsky WS (fixation d'azote)

Une solution stock	5ml
D-glucose	0.5g
CaCO ₃	0.1g
Eau distillée	1000ml
pH	6.2 ajusté avec H ₂ SO ₄

Composition de solution stock :

KH ₂ PO ₄	20g
MgSO ₄ .7H ₂ O	25g
NaCl	25g
FeSO ₄ .7H ₂ O	1g
MnSO ₄ .4H ₂ O	1g
Eau distillée	1000ml
pH	7.2

Annexe 9 : Solution Chrome Azurol S (CAS)

- Mettre 6 ml de HDTMA (Hexamethylammoniumbromure) 10mM dans une éprouvette de 100 ml et diluer à 50 ml avec de l'eau désionisée. **(1)**
- Mélanger 1,5 ml de FeCl₃ + (1mM FeCl₃ +.6 H₂O ; 10 mM HCL) avec 7,5 ml de CAS 2mM. **(2)**
- Ajouter **(2)** à **(1)**.
- Dissoudre 4,307 g de pipérazine anhydre dans de 1 'eau et ajouter 6,25 ml de HCL 12 M (Solution tampon pH = pKa = 5.6).
- Ajouter la solution tampon et continuer avec de l'eau jusqu'à 100 ml.

Annexe 10 : Réactif de Salkowski

- 50ml d'acide perchlorique 35%
- 1ml de FeCl₃ à 0.5 M
- Quelques gouttes d'acide ortho-phosphorique.

Annexe 11 : Le bouillon SNB (Synthetic Nutrient Deficient Broth)

Glucose	0,2g
Saccharose	0,2g
KH ₂ PO ₄	1g
KNO ₃	1g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,5g
KCL	0,5g
Eau distillée	1000ml
pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C	5.4 ± 0.2

Annexe 12 : Gélose d'amidon à 0.5 %.

Gélose nutritive	28g
Amidon	5g
Eau distillée	1000ml

Annexe 13 : Gélose de chitine à 1%

Chitine	10g
Extrait de levure	0.5g
Na ₂ HPO ₄	6g
KH ₂ PO ₄	3g
NaCl	1g
Agar-agar	15g
Eau distillée	1000ml

Annexe 14 : Gélose de pectine à 1%

Pectine	10g
(NH ₂) SO ₄	1.4g
K ₂ HPO ₄	6g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1g
Agar-agar	15g
Eau distillée	1000ml

Annexe 15 : Gélose de CMC (Carboxyméthylcellulose) à 1%

Carboxyméthylcellulose	10g
(NH ₂) SO ₄	1.4g
K ₂ HPO ₄	6g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1g
Agar-agar	15g
Eau distillée	1000ml

Annexe 16 : Gélose de xylane à 1%

Xylane	10g
(NH ₂) SO ₄	1.4g
K ₂ HPO ₄	6g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1g
Agar-agar	15g
Eau distillée	1000ml

Article

Critical Evaluation of Biocontrol Ability of Bayoud Infected Date Palm Phyllospheric *Bacillus* spp. Suggests That In Vitro Selection Does Not Guarantee Success In Planta

Sarah Boulahouat ¹, Hafsa Cherif-Silini ¹, Allaoua Silini ¹, Ali Chenari Bouket ², Lenka Luptakova ³, Nora Saadaoui ¹, Faizah N. Alenezi ⁴ and Lassaad Belbahri ^{5,*}

¹ Laboratory of Applied Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Natural and Life Sciences, University Ferhat Abbas of Setif, Setif 19000, Algeria

² East Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Centre, Plant Protection Research Department, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz 5355179854, Iran

³ Department of Biology and Genetics, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, 04181 Kosice, Slovakia

⁴ Marine Biodiscovery Centre, Department of Chemistry, University of Aberdeen, Old Aberdeen, Aberdeen AB24 3UE, UK

⁵ Laboratory of Soil Biology, University of Neuchâtel, 11 Rue Emile Argand, CH-2000 Neuchâtel, Switzerland

* Correspondence: lassaad.belbahri@unige.ch

Citation: Boulahouat, S.; Cherif-Silini, H.; Silini, A.; Chenari Bouket, A.; Luptakova, L.; Saadaoui, N.; Alenezi, F.N.; Belbahri, L. Critical Evaluation of Biocontrol Ability of Bayoud Infected Date Palm Phyllospheric *Bacillus* spp. Suggests That In Vitro Selection Does Not Guarantee Success In Planta. *Agronomy* **2022**, *12*, 2403. <https://doi.org/10.3390/agronomy12102403>

Academic Editor: Victor Galea

Received: 22 August 2022

Accepted: 30 September 2022

Published: 4 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The vascular wilt of date palm (*Phoenix dactylifera* L.), also known as Bayoud and caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (FOA), is the most destructive disease in North Africa. The disease has resulted in huge economic losses due to declining crop yield and quality. The use of potential biocontrol agents is a sustainable and environmentally friendly strategy compared to synthetic fungicides. The use of date palm-associated microflora for the screening of native antagonistic bacteria with potential applications is the most promising way to control this disease. Thus, the epidemic palm groves (in the valley of M'zab-Ghardaia-Algeria) were chosen for the isolation of rhizospheric bacteria and endophytes from the soil and roots of healthy or infected plants. A total of 8 bacterial isolates (83, 84, 300, 333, 322, 260, 249, and 227) selected from 75 FOA-active strains, showed strong activity against several strains of FOA and other major plant pathogens. Their phylogenetic identification proved they belong to the genus *Bacillus* (*Bacillus* sp., *B. subtilis*, *B. atrophaeus*, *B. halotolerans*, *B. amyloliquefasciens*, and *B. paralicheniformis*). Bacterial cultures and a cell-free culture supernatant tested alone or in co-culture showed FOA inhibitory activity. However, the effect of the co-culture did not show any synergy in both cases. Unlike diffusible compounds, volatile organic compounds did not show a significant antifungal ability. The concept of selecting biocontrol agents in vitro does not always guarantee in vivo performance. In addition to antibiosis, other strategies such as competition and resistance induction are required for biocontrol agent efficacy. To evaluate the biocontrol effect in vivo, germinated seeds of date palm were treated with bacteria, infected with the pathogen, and then incubated for 45 days at room temperature in the dark. The majority of the strains (84, 300, and 333) tested showed moderate fungistatic effects and the protection rate reached an average of 60%. In particular, promising results were obtained with *B. paralicheniformis* strain 260 which significantly protected palm seeds up to 85%, compared to its in vitro test where a low inhibition rate (27.77%) was recorded. Screening methods should be equipped with multifactorial or plant-mediated control mechanisms. Furthermore, these bacteria have shown other potentialities to improve plant growth and resist stressful conditions. Thus, an effective biocontrol agent must combine several beneficial characteristics to be used successfully in situ. In this respect, *Bacillus* remains the best candidate for biological control.

Keywords: *Phoenix dactylifera*; *Bacillus*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*; Bayoud disease; secretome; volatilome; antagonism; PGP activities

1. Introduction

Date palm farming plays a very important role in the agriculture and economy of desert regions. The date palm (*Phoenix dactylifera* L.) is the main desert fruit crop in arid regions and is the mainstay of oasis ecosystems [1,2]. On the socio-economic level, the date constitutes the principal production of the Saharan regions. Indeed, it contributes to the agricultural income of the populations of these regions [3] and constitutes the basis of human and animal food. They are also a vital part of the culture and agrobiodiversity of the region. Furthermore, dates are not only a staple food but also an important export cash crop [4]. The highly appreciated Deglet Nour variety, both on the national and international markets, constitutes 51.8% of total Algerian date palm production and places Algeria fourth among the producing countries in the world [5].

Nevertheless, date palms are susceptible to several diseases and pests that limit date production. Many serious date palm diseases have been reported in the association of different *Fusarium* species [6,7]. *Fusarium oxysporum* (Fo) is a soil-borne plant pathogen causing a devastating effect on agricultural crops worldwide. It is one of the fungal species that causes a significant reduction in crop yield and quality and exhibits a high level of host specificity. This pathogen contains several special forms diverse in morphology and physiology, representing different levels of virulence depending on the host range [8]. *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (FOA) infects the date palm and results in the vascular wilt called Bayoud which is, without a doubt, the most serious cryptogamic disease of the date palm. It is a real scourge of date palm areas in part of North Africa and poses a threat to neighboring countries [9]. It is classified on the EPPO "A2" list of quarantine organisms and on the "A" list of harmful organisms against which monitoring and control are compulsory in Algeria [10,11]. Since its first appearance at the end of the 19th century in Morocco, the disease has spread to all date-producing areas of Morocco, part of Algeria, and Mauritania [12,13]. The number of date palms destroyed by the disease is more than 12 million in Morocco and three million in Algeria [14,15]. Bayoud was a disease originating from the Draa Valley in Morocco, first observed around 1870 [15]. Since then, the epidemic progressed towards the east and reached the west of Algeria in 1898 [16]. Its extension continued towards the southwest and the central Sahara of Algeria in 1941. Then, it propagated in the palm groves of central Algeria, reaching Metlili in 1950, the region of M'zab (Ghardaia) in 1965, El Atteuf in 1967 [11], and El Ménéa in 1978 but the disease was eradicated from this oasis [17] (Figure 1).

FOA attacks palm trees by penetrating the roots and progressing through the entire vascular system to colonize it by migrating into the libero-ligneous vessels [18]. Specific symptoms appear as a brown color along the conductive vessels and side of the rachis. Symptoms of the affected leaves progress through the appearance of a palm in the middle crown which dries up and turns white, hence the Arabic name of Bayoud, deriving from Abied, meaning white [11]. The leaflets dry out from bottom to top and fold towards the rachis. The palm takes on the characteristic appearance of a wet feather. Affected palms eventually dry out, leading to the death of the tree in a few weeks to several months [9].

To date, no curative treatment exists against this fungus [19]. The means recommended against the disease are chemical control (use of fungicides, eradication, and incineration of the palm, soil disinfection by solarization, and fumigation). Unfortunately, chemical control affects beneficial soil microbiota and can accumulate in the food chain [20]. Fungicides have negative effects on the environment and human health and can promote the development of new resistant strains of fungi [21]. In addition, the use of resistant cultivars does not provide a high food quality in dates [22]. Most commercial

varieties, such as Deglet-Nour, are very susceptible and require intensive management to protect it against the pathogen.

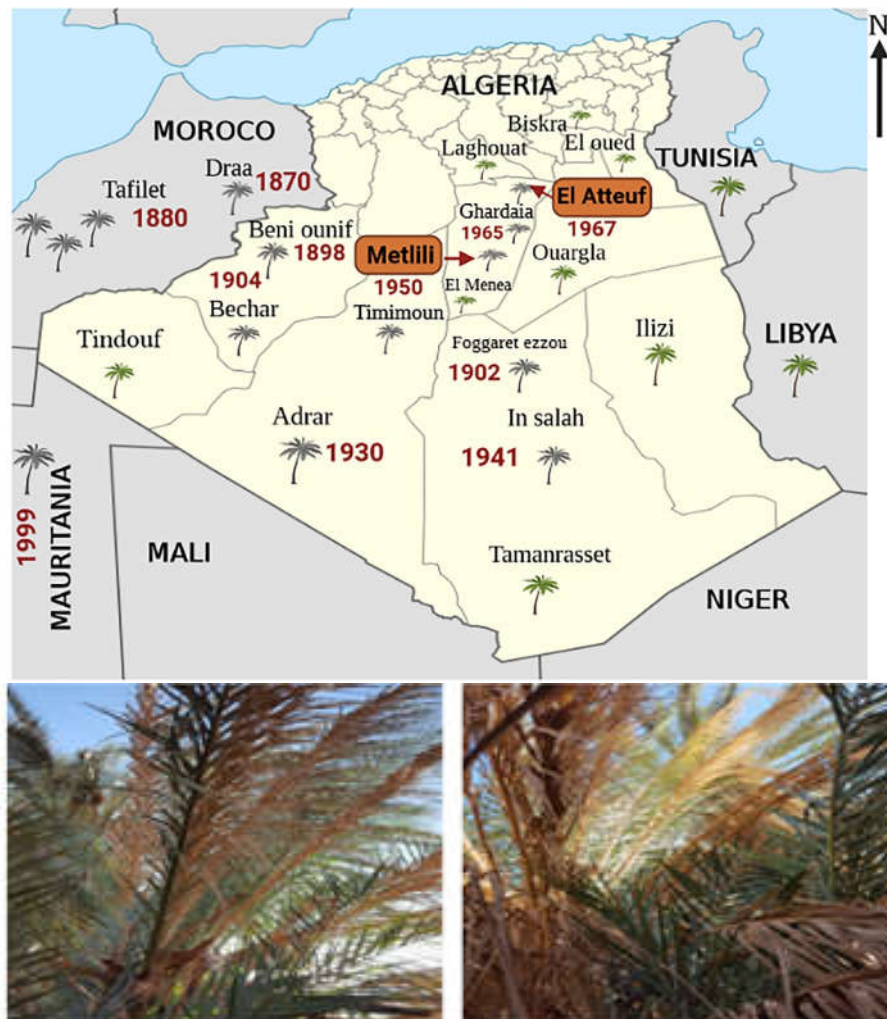


Figure 1. The spread of Bayoud disease in North Africa and Algeria. Location of sampling sites (A). Bayoud disease symptoms on infected palms (B).

Biological control remains the most effective method. The use of microorganisms is one of the most promising biological control methods to suppress plant diseases. Novel approaches involve the use of plant growth promoting bacteria (PGPB) which are categorized as those associated with the surface of plant roots, called rhizobacteria, and those that live inside plant tissues, called endophytes [23,24]. These bacteria are known for their abilities to promote and stimulate plant growth and protect host plants against phytopathogens [25]. Their biocontrol activities are attributed to intra-rhizospheric competition such as antagonism, competition for nutrients and resources, production of antibiotics or diffusible and volatile secondary metabolites, and activation of the plant defense by inducing systemic resistance (ISR) [26–28].

To undertake biological control of these diseases, the choice of microorganisms antagonistic to the pathogen is a very important criterion. The antagonists must be effective in situ by showing a significant aptitude for competition or antibiosis. In addition, they must persist in soils and be able to rapidly colonize plant roots. Therefore, it is very important to develop a reliable and practical strategy for screening effective inoculants with broad-spectrum resistance against several environmental stresses [29].

Selection procedures for appropriate bacterial inoculants are a limiting step to successful biocontrol. In vitro selection procedures used as a screening method, such as the dual culture of fungal pathogens on agar plates, may be inappropriate as they exclude host-antagonist-pathogen interaction factors and do not allow for the selection of biocontrol agents using other mechanisms such as root colonization, induction of systemic resistance, and/or niche competition [30]. Although the majority of studies use metabolite production on culture media for screening tests, only a few studies have compared the results of different screening strategies and concluded that whole plant testing was the most effective strategy [31–33]. Screening methods must have multifactorial or plant-mediated control mechanisms [29].

The most studied bacteria in biocontrol are members of the genera *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, and *Pseudomonas*. *Bacillus* is one of the most abundant genera in the soil and the most studied as a biological control agent. It has been isolated from the rhizosphere of various plants [23,34]. These particular biocontrol agents are used, not only, to substitute chemical pesticides but to improve plant growth and mitigate various natural environmental stresses (salinity, aridity, extreme temperature, and pH) [35,36]. In addition to its various plant health benefits, *Bacillus*, with its ability to form resilient spores, is actually a very promising target for agricultural applications [37]. The spores are highly resistant to various abiotic stresses which facilitates their formulation for agricultural application [38]. The existence of several desirable traits in a single inoculant or a consortium of bacteria could, therefore, be successfully used in such studies [29,35].

The present study aims to propose the use of potential antagonistic bacteria indigenous to the palm rhizosphere to control a serious palm disease. To achieve this objective, bacterial strains (rhizospheric and endophytic) with antifungal activity against FOA are isolated from the roots of healthy and infected date palms from the Ghardaïa region. The most efficient antagonistic bacteria are tested for their antagonism towards other phytopathogens, their PGP and enzymatic potential, and their tolerance to abiotic stress. Finally, to evaluate their performance in the biocontrol of FOA, these bacterial strains are tested in vivo on the roots of a Deglet Noor date palm infected by the pathogen.

2. Materials and Methods

2.1. Description and Location of Sampling Sites

Sampling was from two sites; El Atteuf located in the M'zab region at 9 km east of Ghardaïa city (32°28'49.0" N, 3°44'55.2" E), and Metlili, also located in the M'zab region at 40 km south of Ghardaïa city (32°20'12.1" N, 3°36'35.4" E) (Figure 1A,B). The samples consisted of rhizospheric soil from healthy (HRh) and infected (IRh) palm trees, non-rhizospheric soil (SNRh) and roots from healthy (HR) and infected (IR) palm trees. The samples were taken randomly from two palm trees, at least six meters apart, and the samples were then mixed to obtain a representative sample. Each sample was collected in a sterile container kept cool and transported to the laboratory. The samples were achieved in triplicate.

2.2. Isolation and Screening of Antagonistic Bacterial Strains

2.2.1. Bacteria Isolation

Bacteria were isolated from different samples using three culture media: Trypticase Soja Agar (TSA) (containing g L⁻¹: casein peptone, 15; soya peptone, 5; sodium chloride, 5; agar, 15; and 1 L distilled water; final pH 7 ± 0.2) [39], King B agar (containing g L⁻¹: peptone, 20; glycerol, 10; K₂HPO₄, 1.5; MgSO₄ · 7 H₂O, 1.5; agar, 12; and 1 L distilled water; final pH 7 ± 0.2) [40], and GYM *Streptomyces* (Glucose Yeast Malt) agar (containing g L⁻¹: glucose, 4; yeast extract, 4; malt extract, 10; CaCO₃, 2; Agar 12; and 1 L distilled water; final pH 7 ± 0.2). A total of 1 g of soil was added to 10 mL of sterile physiological water (0.85% NaCl). The mixture was stirred for 30 min then a decimal dilution series was made. In total, 0.1 mL of each dilution was plated onto different agar media. For endophyte isolation, 1 g of roots were rinsed with water then disinfected with 70% ethanol for 3 min and

sterilized with 3% sodium hypochlorite for 15 min. The roots were then rinsed several times with sterile distilled water and the last rinse was incubated at 30 °C/24 h on TSA agar to check disinfection. The sterilized roots were crushed in a sterile mortar and then added to 10 mL of sterile physiological water. Decimal dilutions were made, and 0.1 mL of each dilution was then plated onto different agar media; plating Petri dishes were conducted in duplicate. Plates were incubated at 30 °C for 48 h. The number of CFU (N) was counted and the result was expressed in log CFU/g of soil or roots according to the following formula:

$$N = \sum C / (n_1 + 0.1n_2) \times V \times d$$

(C: number of colonies counted on all plates having a number between 15 and 300 colonies, n_1 : number of plates retained at the first dilution, n_2 : number of plates retained at the second dilution, V: volume of the inoculum expressed in mL, and d: dilution rate corresponding to the first dilution retained).

Colonies with a different morphology were sub cultured in order to obtain bacterial pure cultures. The bacterial strains obtained were stored for a short period in slants agar at 4 °C, and for a long period at -20 °C in a medium supplemented with 30% glycerol.

2.2.2. Fungal Isolates

Fusarium oxysporum f.sp. *albedinis* isolates (FOA1, FOA2, FOA3, FOA4, and FOA5) were kindly provided by the National Institute for Plant Protection-Algeria. The pathogenic fungi were isolated from the Ghardaia region and identified by this institute. Other phytopathogenic fungi (*Alternaria alternata* Aa, *Phytophthora infestans* Pi, *Fusarium solani* Fs, and *Fusarium graminearum* Fg) were obtained from the collection of Laboratory of Applied Microbiology (Faculty of Nature and Life Sciences, University Ferhat Abbas of Setif) as described by Slama et al. [23].

2.2.3. Screening for In Vitro Antagonism

The in vitro antifungal activity was assessed by a dual culture assay on the basis of the hyphal growth rate of filamentous fungi, comparing the presence and absence of the isolated bacterial cultures [41]. A total of 335 isolated bacterial strains from different samples (HRh = 126, IRh = 91, SNRh = 62, HR = 33, and IR = 23) were screened for their activity against FOA1. The antifungal activity was performed on PDA (Potato Dextrose Agar). The Agar disc of a fresh fungal culture was placed in the center of the PDA plate. A total of 2 µL of each fresh bacterial culture was spotted at 3 cm from the fungal strain. A negative control containing plates without antagonistic bacteria was also conducted. Plates were incubated at 28 °C for 7 days. The percentage inhibition was calculated according to the following formula:

$$PI\% \text{ (Inhibition percentage)} = 1 - (a/b) \times 100\%$$

Where a is the distance of the fungus growth in the Petri dish inoculated with the bacterial isolate and b is the distance of the fungus growth in the control Petri dish without bacteria.

2.3. Antifungal Potential of Selected Isolates

Eight selected bacterial strains from different samples named 83, 84 (HRh), 300 (IRh), 333, 322 (SNRh), 260, 249 (IR), and 227 (HR) showing better inhibition rate against FOA, were examined for their ability to inhibit the growth of different strains of FOA (FOA1, FOA2, FOA3, FOA4, and FOA5) and other phytopathogenic fungi (Aa, Pi, Fs, and Fg). The antagonism of bacterial isolates toward phytopathogenic fungi was performed in vitro using PDA plates by the dual culture method. Each bacterial culture (10^8 cells/mL) was inoculated on the PDA by a horizontal streak at the end of the Petri plate. An agar disc of each fresh fungal culture was placed on the other end of the Petri plate. Plates were incubated for 7 days at 28 °C. The plates not inoculated with the antagonistic bacteria were considered a negative control. The percentage inhibition was calculated according to the previous formula.

2.4. Molecular Characterization of Selected Bacterial Strains

DNA extraction from the eight selected bacteria (83, 84, 227, 249, 260, 300, 322, and 333) was performed according to Luchi et al. [42]. Estimation of DNA quality and quantity was also assessed. Amplification and sequencing were performed as previously. Phylogenetic analyses were performed according to Mefteh et al. [43].

2.5. Antagonistic Effect of Bacterial Co-Culture

This test was performed to detect a possible synergy of bacterial co-culture to improve the antagonistic activity [44]. Bacterial suspensions were obtained by growing the bacterial strains (83, 84, 227, 249, 260, 300, 322, and 333) with different combinations of two bacteria inoculated together in Tryptic Soy Broth (TSB) that resulted in 28 combinations. The bacterial culture was incubated for 24 h at 30 °C. After incubation, the antagonism was conducted by the dual-culture method. Each bacterial culture containing each combination (10^8 cells/mL) was inoculated on the PDA by a horizontal streak at the end of the Petri plate. An agar disc of each fresh fungal culture was placed on the other end of the Petri plate. Plates were incubated for 7 days at 28 °C. The plates not inoculated with the antagonistic bacteria were considered a negative control. The percentage inhibition was calculated according to the previous formula.

2.6. Antagonistic Effect of Cell-Free Supernatant

To test the antifungal activity of the cell-free supernatant, the bacterial isolates were inoculated individually or in pairs in 20 mL of TSB medium and incubated at 30 °C for 48 h with stirring. The bacterial suspensions (10^8 cells/mL) were then centrifuged at 5000 rpm for 15 min. The bacterial supernatants were incorporated aseptically into a supercooled PDA medium (at 25%) supplemented with oxytetracycline at 100 µg/mL and poured into Petri dishes. An agar disc of fungal culture was placed in the center of the PDA medium. Petri dishes inoculated with the fungus without bacterial supernatant were considered negative controls [45]. The percentage of inhibition was calculated after incubation for 7 days at 28 °C according to the previous formula.

2.7. Antifungal Activity by Volatile Organic Compounds (VOCs)

The antagonistic effect of the volatile substances produced by the bacterial strains was tested on the mycelial growth of FOA. Petri plates split into two compartments were used. Bacterial cultures (10^8 cells/mL) were inoculated by streaking on a TSA medium contained in one compartment of the Petri plate and a fungal agar disk from an FOA culture was inoculated on a PDA medium contained in the other compartment [46]. A negative control consisted of a plate inoculated only with the fungus. The plates were then sealed and incubated at 28 °C for 7 days. The percentage inhibition was calculated using the previous formula.

2.8. In Vivo Biocontrol Assay for the Reduction in Date Palm Root Disease Using Selected Bacteria

The selected bacteria were tested for their ability to inhibit the growth of the fungus in vivo. The strains were cultured in 5 mL of LB broth (Luria–Bertani) and incubated at 30 °C for 24 h with stirring. A total of 1 mL of each bacterial culture was introduced into 50 mL of LB medium. After incubation for 48 h at 30 °C with stirring, the cultures were centrifuged at 5000 rpm for 15 min and the bacterial pellets were suspended in 50 mL of sterile distilled water. The cultures were adjusted to a concentration of 10^8 cells/mL. Date palm seeds of the Deglet Nour variety, previously disinfected, were germinated aseptically in Petri plates lined with absorbent paper soaked in sterile distilled water for 15 days. Then, 10 germinated seeds were soaked in each bacterial suspension for one hour and subsequently infected after 24 h with 1 mL of an FOA spore suspension adjusted to 10^5 spores/mL. Seeds were placed in Petri plates lined with absorbent paper soaked in water,

sealed, and incubated at room temperature in the dark for 45 days. The experiment was repeated four times. Seeds infected only with FOA in the absence of bacteria were considered a positive control and seeds which were neither infected nor treated were considered a negative control. The degree of protection was assessed by calculating the percentage of infection expressed by the number of diseased seeds/total number of seeds \times 100 and by the size of the necrosis of diseased roots measured (cm) by a graduate ruler.

2.9. Effect of Salt, pH, PEG, and Temperature on the Growth of Bacterial Strains

The ability of bacterial strains to tolerate salt stress, water stress, and different pH values was carried out on TSA agar containing increasing concentrations of NaCl (0, 200, 400, 600, 800, 1000, and 1200 mM), PEG% (10, 20, 30, and 40), and different pH values (4, 7, 9, and 10). A total of 2 μ L of each bacterial culture was inoculated by spots on the agar media and incubated at 30 °C for 48 h. The ability of the strains to grow under different temperatures was carried out on TSA agar incubated at 4, 10, 20, 30, 37, 45, and 50 °C for 48 h. Any bacterial growth indicated the ability of the strains to tolerate different abiotic stresses [25].

2.10. Determination of Resistance to Heavy Metals

The resistance of bacterial strains to lead, cadmium, cobalt, and mercury was evaluated on a solid LB medium supplemented with the various metallic salts PbCl₂, Cd(NO₃)₂, CoCl₂, and HgCl₂, at concentrations of 100, 250, 500, and 1000 ppm. A total of 10 μ L of each bacterial suspension were spotted on agar media and incubated for 24 h. Any bacterial growth after incubation at 30 °C for 72 h indicated the ability of the isolates to resist heavy metals [47].

2.11. PGP Potentialities of Bacterial Isolates

The production of the phytohormone indole acetic acid (IAA) was detected on LB broth supplemented with tryptophan (2 g/L). The absorbance of the bacterial culture supernatants supplemented with the Salkowski reagent were recorded at 535 nm [48]. IAA concentrations were determined by comparison with a standard curve generated from different IAA concentrations. The ability of bacterial strains to solubilize phosphates was detected in the Pikovskaya medium. The soluble phosphate was measured in the supernatant according to Olsen and Sommers [49]. The phosphate concentration was determined by measuring the optical density at 610 nm. A calibration curve was made to determine the phosphate concentration. The production of siderophores was determined using the Chrom azurol S (CAS) test [50]. Siderophore production was assessed by inoculating the King B medium. The absorbance of culture supernatants supplemented with CAS solution was measured at 630 nm. The percentage of siderophore production was expressed by calculating the following formula expressed as a percentage: $SP(\%) = OD \text{ of the sample} / OD \text{ of the control (CAS solution)}$ [51].

Other fertilization and biocontrol tests of bacterial isolates were determined qualitatively. The ability to fix atmospheric nitrogen was detected by the growth of bacteria on a nitrogen-free medium after incubation at 30 °C for 3 days. The production of NH₃ was performed on a peptone water medium [52]. The cultures were incubated at 30 °C for 2 days. After the addition of Nessler's reagent (0.5 mL), the appearance of a yellowish to brownish color indicated NH₃ production. The HCN production test was performed on agar supplemented with glycine (4.4 g/L) [53]. A disc (9 cm) of paper impregnated with a solution of sodium picrate was placed at the bottom of the Petri plate lid. The plates were sealed and incubated at 30 °C for 2 days. A change in the color of the paper from yellow to orange indicated a positive result.

2.12. Screening for Bacterial Hydrolytic Enzymes

The capacity of the isolates to produce hydrolytic enzymes was tested on an agar medium supplemented with the corresponding substrates allowing the release of the enzymes. The production of cellulase, chitinase, amylase, xylanase, and pectinase were tested on an agar medium containing, respectively, carboxymethylcellulose (1% w/v), chitin (1% w/v), starch (0.5% w/v), xylan (1% w/v), and pectin (1% w/v). The media were inoculated by spotting bacterial cultures. The Petri dishes were incubated for 3 days at 30 °C. The degradation of the substrates resulted in the appearance of a clear halo around the colony after exposure by pouring an iodine solution (0.3 g iodine and 0.6 g KI/L) on the Petri plate's surface. The lipase activity was tested on an agar medium supplemented with tween 20 (sorbitol oleate) [54] inoculated by spotting and incubated at 30 °C for 3 days. The degradation of the tween resulted in the appearance of an opaque halo around the colony due to the precipitation of calcium oleate. Protease production was performed on skimmed milk agar media [55]. The plates were inoculated by spotting and then incubated at 30 °C for 3 days and the protease activity was recorded by the development of a clear zone (halo) around the colonies. The results of the different enzymatic activities were expressed by measuring the diameter of the enzyme production halos.

2.13. Statistical Analyses

All the experiments were repeated three times and the results were expressed as mean \pm standard error of the mean. The data were analyzed using GraphPad Prism 8. One-way ANOVA and two-way ANOVA were used to analyze the data to find whether there was a significant effect of the treatment compared to the control sample. A significant level of 5% ($p < 0.05$) was used, and Tukey's multiple comparison tests were performed when a significant difference was encountered.

3. Results

3.1. Enumeration, Isolation, and Selection of Antagonistic Bacteria

A total of 335 bacterial strains forming different characteristic colonies were isolated from healthy (126) and infected (91) rhizospheric soil, non-rhizospheric soil (62) and healthy (33) and infected (23) roots. All isolates grew on TSA, King B, and GYM media. The bacterial count (log CFU/g) revealed that the rhizospheric bacterial density was higher than those of non-rhizospheric bacteria and endophytic bacteria (Figure 2A).

The rate of isolates showing antifungal activity against FOA1 is shown in Figure 2B. Of the 335 isolates tested, 75 were able to inhibit FOA growth in vitro (Table S1). The results showed that 19.84%, 26.37%, 17.74%, 27.27%, and 26.08% of active strains were isolated, respectively, from healthy rhizospheric soil, infected soil, non-rhizospheric soil, and healthy and infected roots. Indeed, the number of antagonistic endophytic and rhizospheric bacteria was higher than that of non-rhizospheric bacteria.

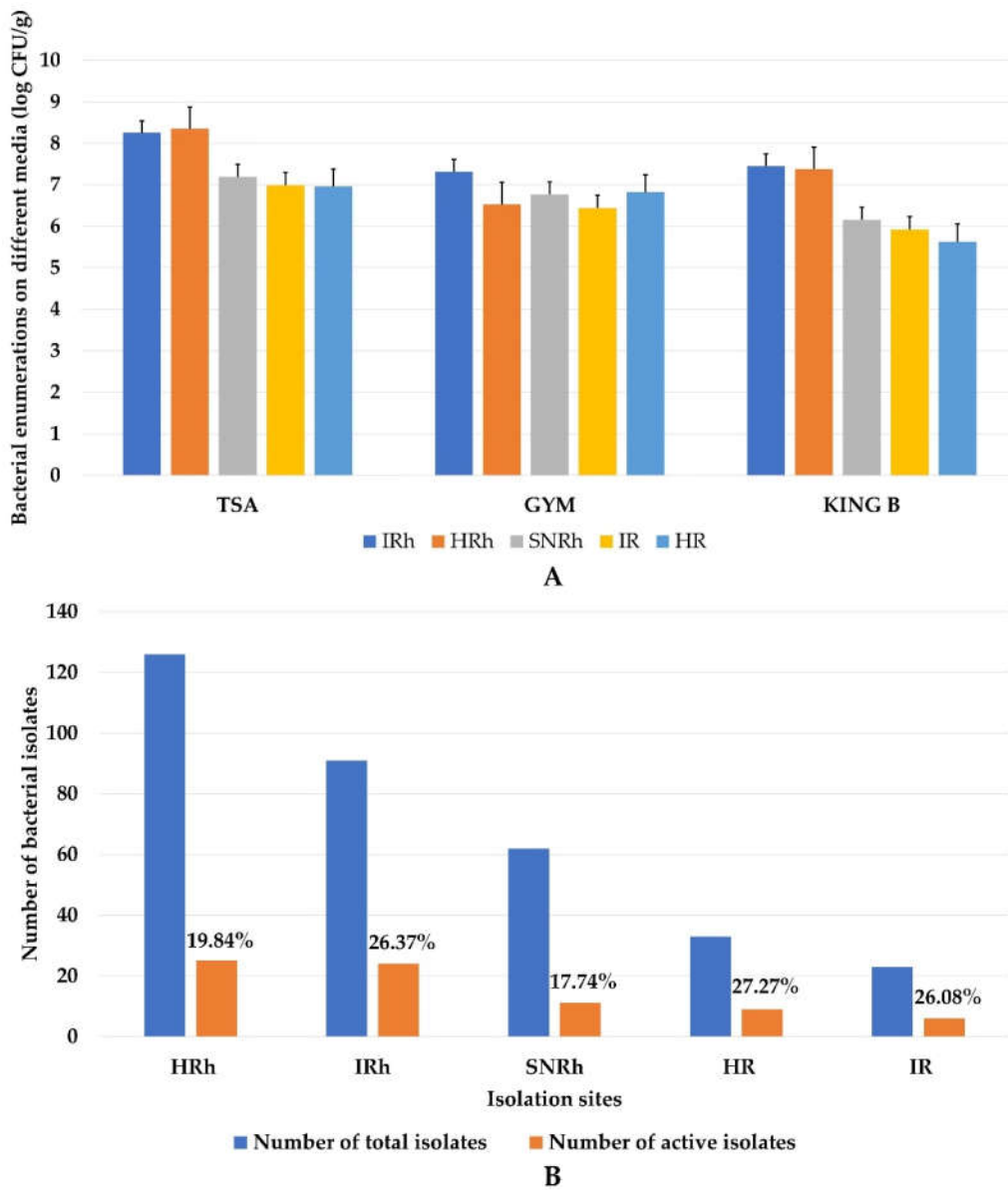


Figure 2. (A) Bacterial enumeration of healthy (HRh) and infected (IRh) rhizospheric soil, non-rhizospheric (SNRh) soil, and endophytes of healthy (HR) and infected (IR) roots in different culture media (TSA, GYM, and King B); (B) The percentage of bacteria antagonistic to FOA by isolation site (HRh, IRh, SNRh, HR, and IR).

3.2. Biocontrol Ability of Bacterial Isolates towards FOA and Other Phytopathogenic Fungi

Among the 75 FOA antagonistic bacteria, 8 strains from different sampling compartments (83, 84, 300, 333, 322, 260, 249, and 227) having the best inhibition rates were chosen. The bacteria also inhibited additional strains of FOA (FOA1, FOA2, FOA3, FOA4, and FOA5). Strains 333 and 84 showed high inhibitory potential towards FOA strains. A maximum inhibition rate of 52.94% was observed for strain 333 towards FOA5 (Figures 3A and 4). Strain 84 was found to be effective in significantly inhibiting ($p < 0.05$) the growth of FOA1, FOA2, and FOA4 strains with inhibition rates of 48.61%, 46.88%, and 42.85%, respectively. Moreover, weak antagonistic activity was marked by strains 322 and 83 towards all the strains of FOA. The bacterial isolates also showed strong activities against four other phytopathogenic fungi. Isolates 333 and 249 proved to be very effective against

the development of all four fungi (Figures 3B and S1). However, the inhibition rates reached 47.67% against Aa (strain 333) and 43.24% against Fg (strain 249), while a weak antagonistic potential was observed for strains 322 and 83 towards Fg (6.72%) and Fs (10%), respectively.

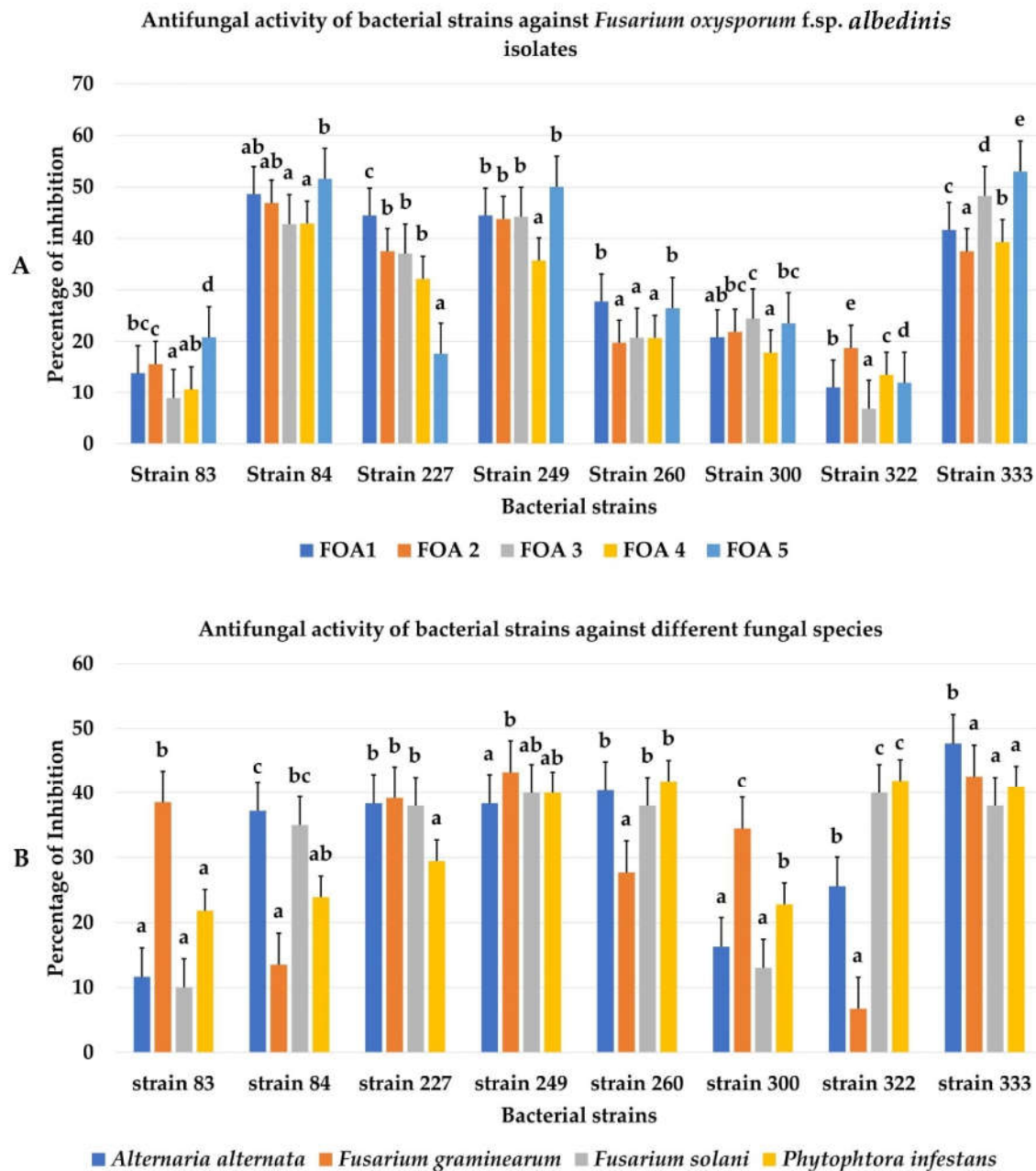


Figure 3. (A) Percentage of inhibition of selected bacterial strains (83, 84, 227, 249, 260, 300, 322, and 333) against different strains of FOA (FOA1, FOA2, FOA3, FOA4, and FOA5). (B) Inhibition rate of bacterial strains against other plant pathogens (*Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium solani*, and *Phytophthora infestans*). The data present the means \pm the standard error. Different letters between bars in each group indicate a significant difference at ($p < 0.05$) determined by ANOVA with the comparison of means using Tukey’s HSD.

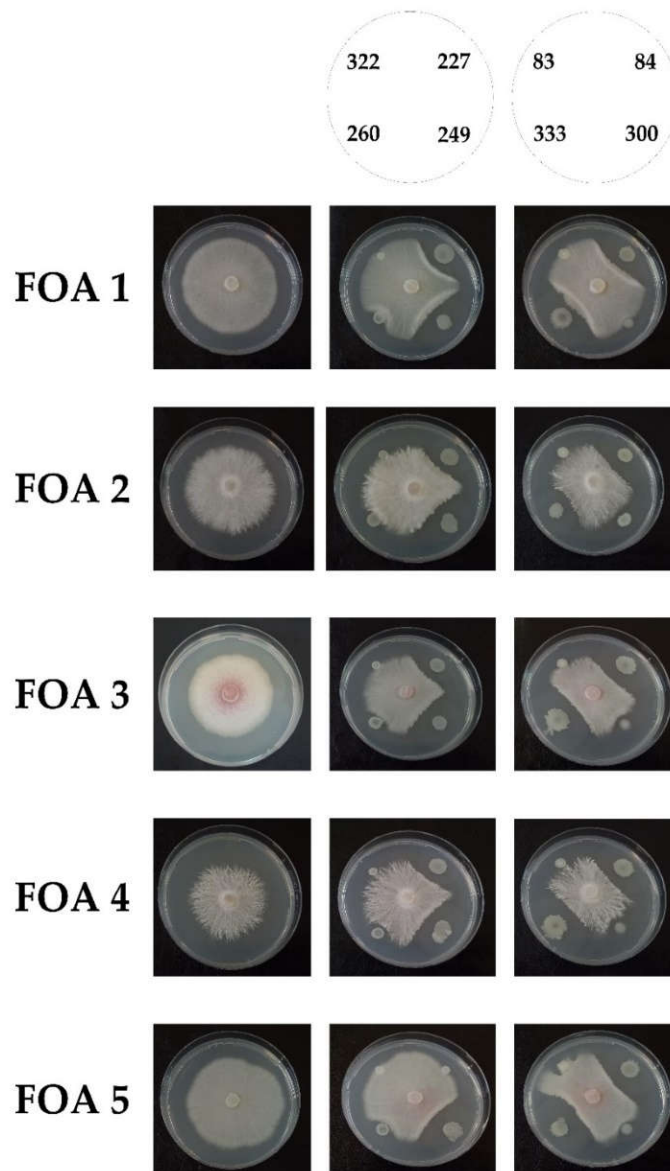


Figure 4. The in vitro comparison test of the antifungal activity of bacterial strains against the different strains of FOA (FOA1, FOA2, FOA3, FOA4, and FOA5).

3.3. Molecular Identification of Bacterial Strains and Their Phylogenetic Positions

The phylogenetic tree based on the comparison of the 16S-rDNA sequences of the strains (227, 300, 249, 333, 83, 84, 322, and 260) with the similar sequences strains available in the databases (GenBank) confirmed that all the strains belonged to *Bacillus* genus (Figure 5). Strains 227, 300, and 249 exhibited homologies with *B. subtilis*. Strains 333, 83, and 84 were identified as *Bacillus* sp., *B. atropheus*, and *B. halotolerans*, respectively. In contrast, 322 and 260 were related to *B. amyloliquefasiens* and *B. paralicheniformis* species, respectively. Their sequences were submitted to GenBank and accession numbers were implied in the tree. The *Bacillus thuringiensis* strain JYCB351 was used as an outgroup.



Figure 5. Maximum likelihood phylogenetic tree of *Bacillus* strains (227, 300, 249, 333, 83, 84, 322, and 260) based on a comparison of the 16S-rRNA gene sequence of bacterial strains with some phylogenetically related strains. Supports for branches were assessed by bootstrap resampling of the dataset with 1000 replicates.

3.4. Effect of Bacterial Co-Culture on FOA Growth

The antifungal activity of the bacterial strains in combined form towards FOA1 is represented in Figures 6 and S2. The antagonistic effect of the bacterial strains co-culture showed inhibition rates of 58.77%, 58.17%, 54.77%, 53.17%, and 53.12% ($p < 0.05$) for the combinations 333 + 83, 333 + 249, 260 + 249, 83 + 260, and 300 + 84, respectively. However, a low inhibition rate of 37.98% was seen in strains 300 + 83. According to the results obtained, the antagonistic effect of the bacterial co-culture did not show an important difference compared to the activity of bacterial strains alone mentioned above.

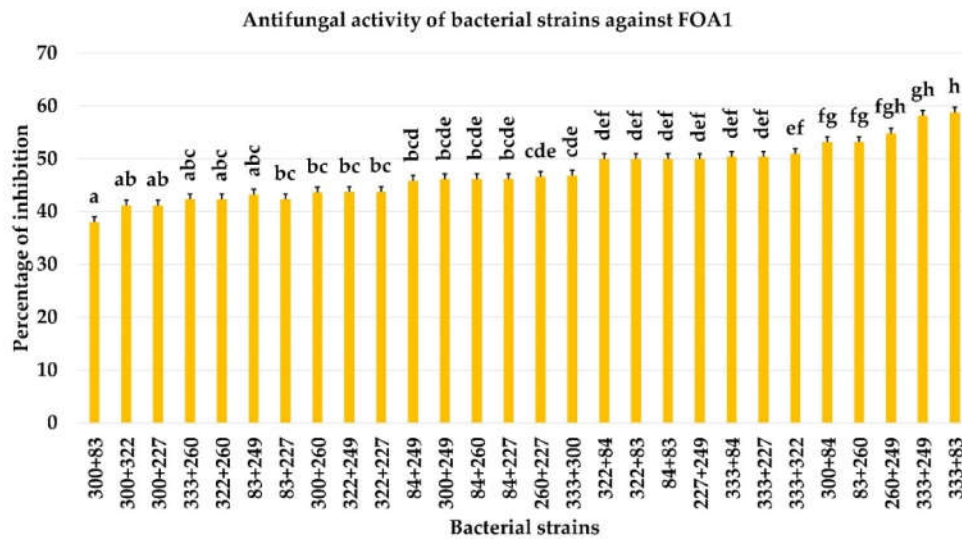


Figure 6. Percentage of inhibition of combined bacterial strains against FOA1. Data shown are the means ± the standard error. Different letters between bars in each group indicate a significant difference at ($p < 0.05$) determined by ANOVA with the comparison of means using Tukey’s HSD.

3.5. Effect of Cell-Free Culture Supernatant on FOA Growth

The results showed an inhibitory effect of cell-free culture supernatant alone or in combination on the growth of FOA1. As indicated in Figures 7 and S3, better inhibitory activity was demonstrated both for the supernatants of the combined bacterial strains 84 + 249 (43.69%), 333 + 249 (42.85%), and 333 + 83 (42.10%) than those of single bacterial strains 84 (42.85%), 249 (42.12%), and 333 (41.92%) ($p < 0.05$). According to the inhibition rates, there was no synergistic or additive effect of the different bacterial supernatants combined on the growth inhibition of FOA1.

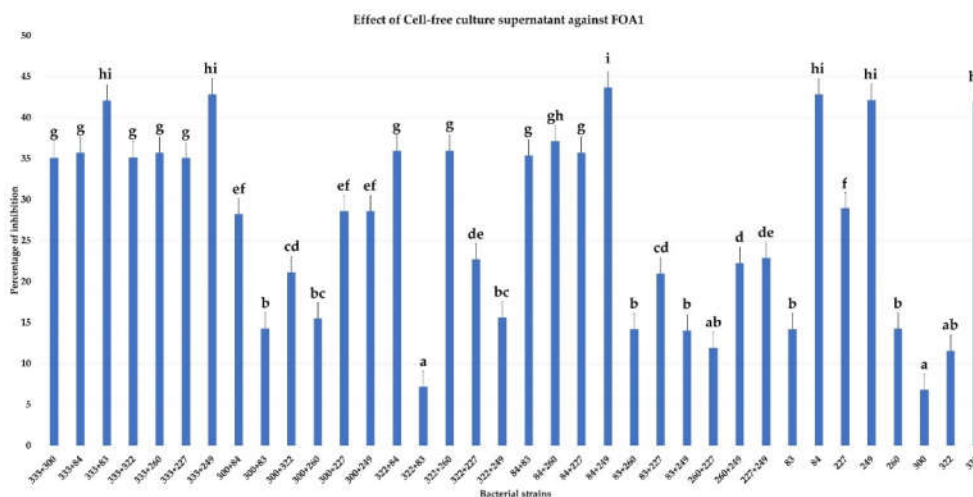


Figure 7. Percentage of inhibition of the cell-free culture supernatants of the bacterial strains alone or combined against FOA1. Data shown are the means ± the standard error. Different letters between bars in each group indicate a significant difference at ($p < 0.05$) determined by ANOVA with the comparison of means using Tukey’s HSD.

3.6. Antifungal Activity by Volatile Organic Compounds (VOCs)

The effect of VOCs produced by bacterial strains on the mycelial growth of FOA1 showed a weak inhibition. However, the volatile substances secreted by strain 260 showed

a good inhibition rate of 28.89% compared to those of other bacterial strains (Figure 8A,B). Moreover, a very weak inhibition of 2.40% was noted by the VOCs produced by strains 300 and 322.

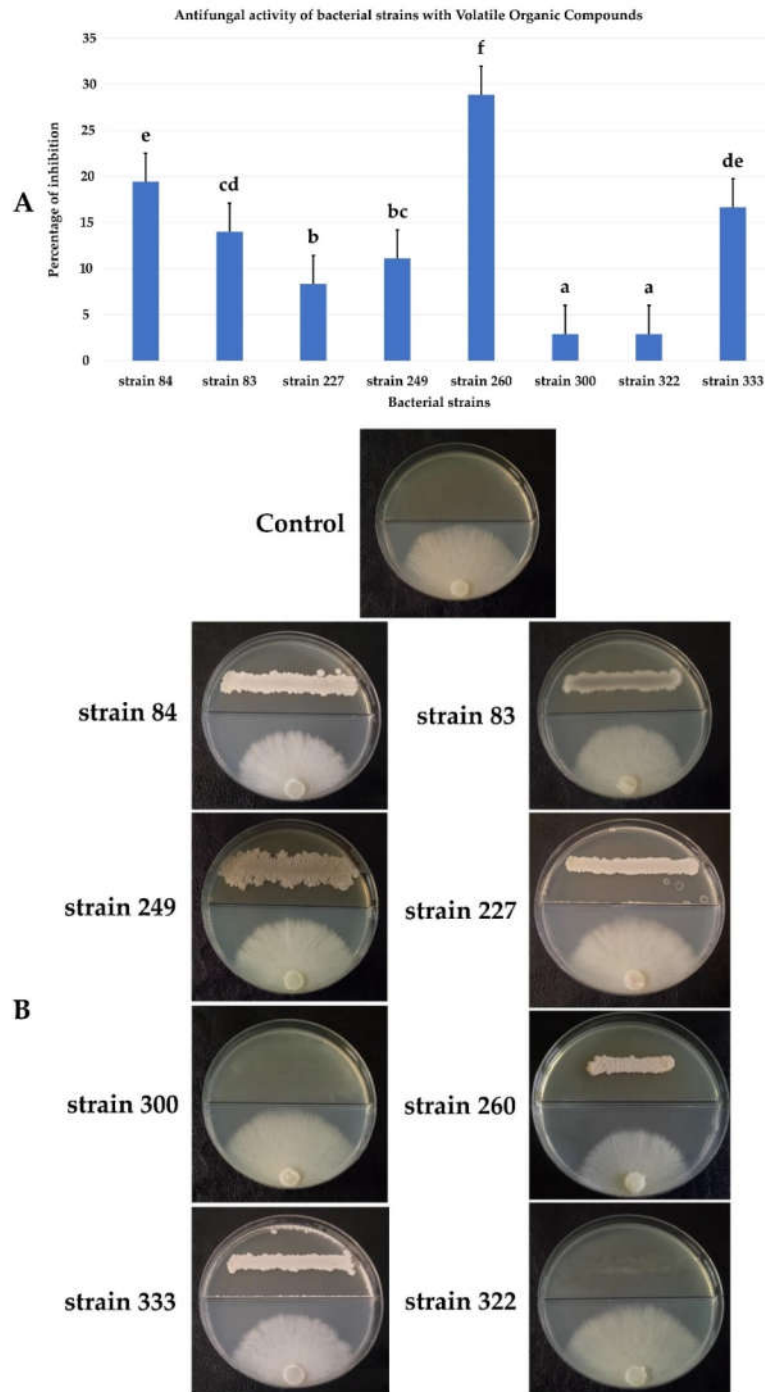


Figure 8. (A) Percentage of inhibition of VOCs produced by bacterial strains towards FOA1. The data present the means \pm the standard error. Different letters between bars in each group indicate a significant difference at ($p < 0.05$) determined by ANOVA with the comparison of means using Tukey’s HSD. (B) The in vitro antifungal effect of the VOCs produced by the bacterial strains on the mycelial growth of the FOA.

3.7. In Vivo Biocontrol Test on Germinated Date Palm Seeds

The ability of bacterial strains to inhibit FOA1 growth was assessed in vivo on the germinated seeds of the date palm variety Deglet Nour. The degree of protection evaluated by the infection rate and the size of root necrosis showed that the majority of strains provided weak protection against FOA infection (Figure 9). However, seeds treated with strain 260 significantly ($p < 0.05$) reduced the infection rate to 15% (Figure 9A) and the size of necrosis to 4.7 cm (Figure 9B). According to the results, strains 84, 300, and 333 protected the germinated seeds by about 60% but the other strains 83, 227, 249, and 322 displayed a lower degree of protection (Figure 9B).

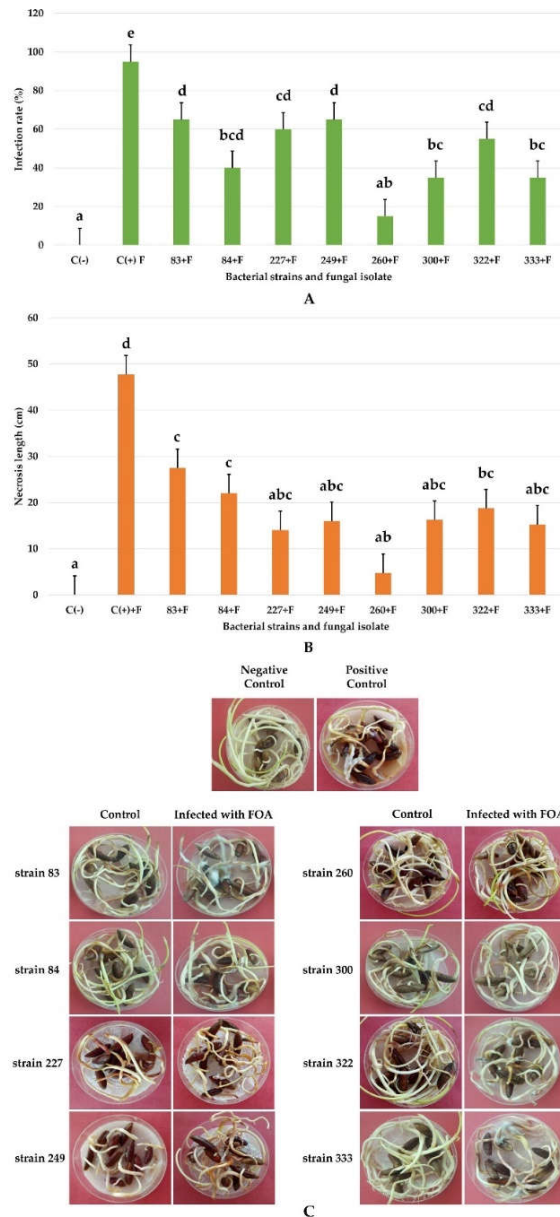


Figure 9. (A) Infection rate, (B) Size of root necrosis of germinated date palm seeds. The data present the means \pm the standard error. Different letters between bars in each group indicate a significant difference at ($p < 0.05$) determined by ANOVA with the comparison of means using Tukey’s HSD. (C) In vivo biocontrol test of date palm seeds infected with FOA and treated at the same time with the different bacterial strains. The seeds considered as negative and positive controls are represented above.

Figure 10. (A) Effects of different concentrations of NaCl, (B) PEG₈₀₀₀, (C) PH values, and (D) temperature on the growth of bacterial strains.

3.9. Determination of Resistance to Heavy Metals

The effect of different concentrations of heavy metals (Hg, Pb, Cd, and Co) on the bacterial growth of strains expressed by the size of the colonies is illustrated in Figure 11. According to the results, the strains seemed to tolerate Pb well. The majority of them were able to grow up to 1000 ppm with strain 249 showing better growth. In addition, the majority of the strains could not grow beyond 250 ppm of Hg and Co, with the exception of strains 260 and 333 which were able to resist up to 500 ppm of Co and Hg, respectively. In contrast, Cd was the most toxic for bacterial growth and the majority of strains hardly tolerated more than 100 ppm.

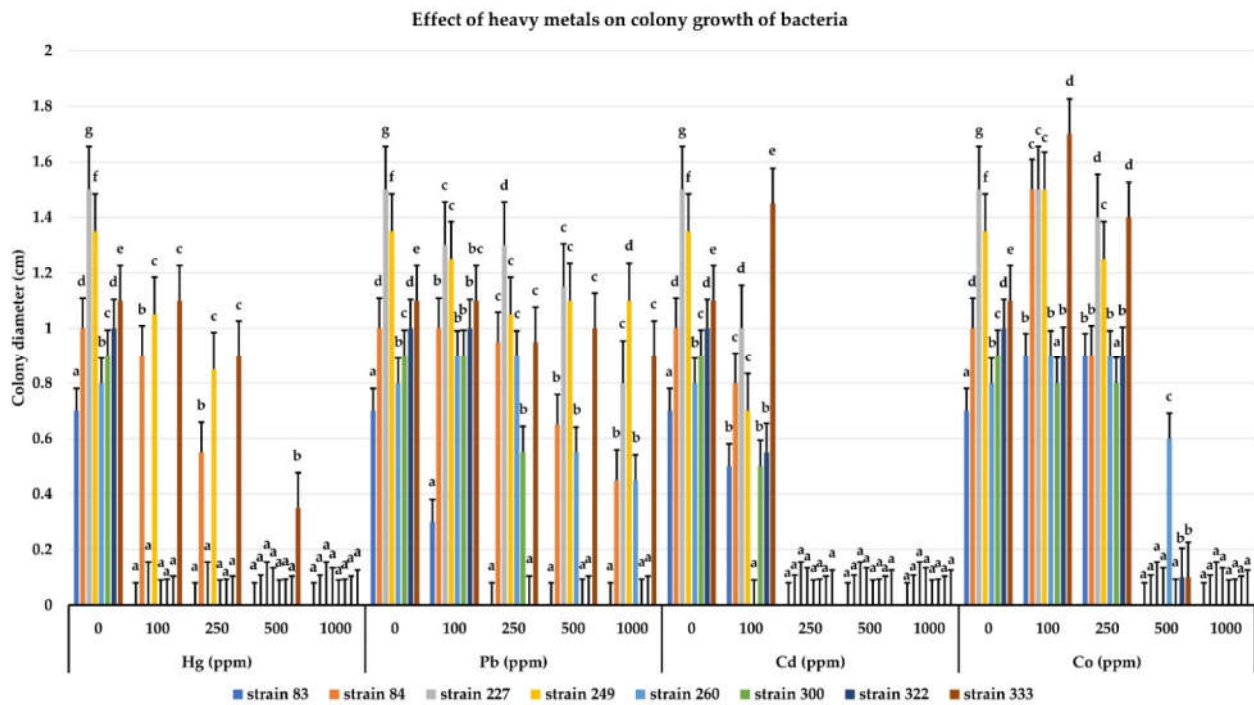


Figure 11. Effects of different concentrations of heavy metals (Hg, Pb, Cd, and Co) on the growth of bacterial strains. The data present the means ± the standard error. Different letters between bars in each group indicate a significant difference at ($p < 0.05$) determined by ANOVA with the comparison of means using Tukey's HSD.

3.10. PGP Potentialities of Selected Strains

The selected bacterial isolates possessed several PGP activities (Figure 12). All strains produced IAA at varying rates and the maximum production was observed for strain 260 (14.12 µg/mL) (Figure 12A). The majority of strains produced siderophores, with the exception of strains 333 and 83. The most efficient strain was 249 (76.23%) (Figure 12B). It was also noted that the strains were efficient in phosphate solubilization. The amount of P₂O₅ produced by the strains varied from 36.86 to 195.88 mg/mL (Figure 12C). The maximum concentration of soluble P₂O₅ was observed in strain 322 (195.88 mg/mL), 300 (180.75 mg/mL), 83 (176.31 mg/mL), and 333 (173.55 mg/mL). Thus, all strains were able to fix nitrogen and produce ammonia. However, they failed to produce HCN (Figure 12D).

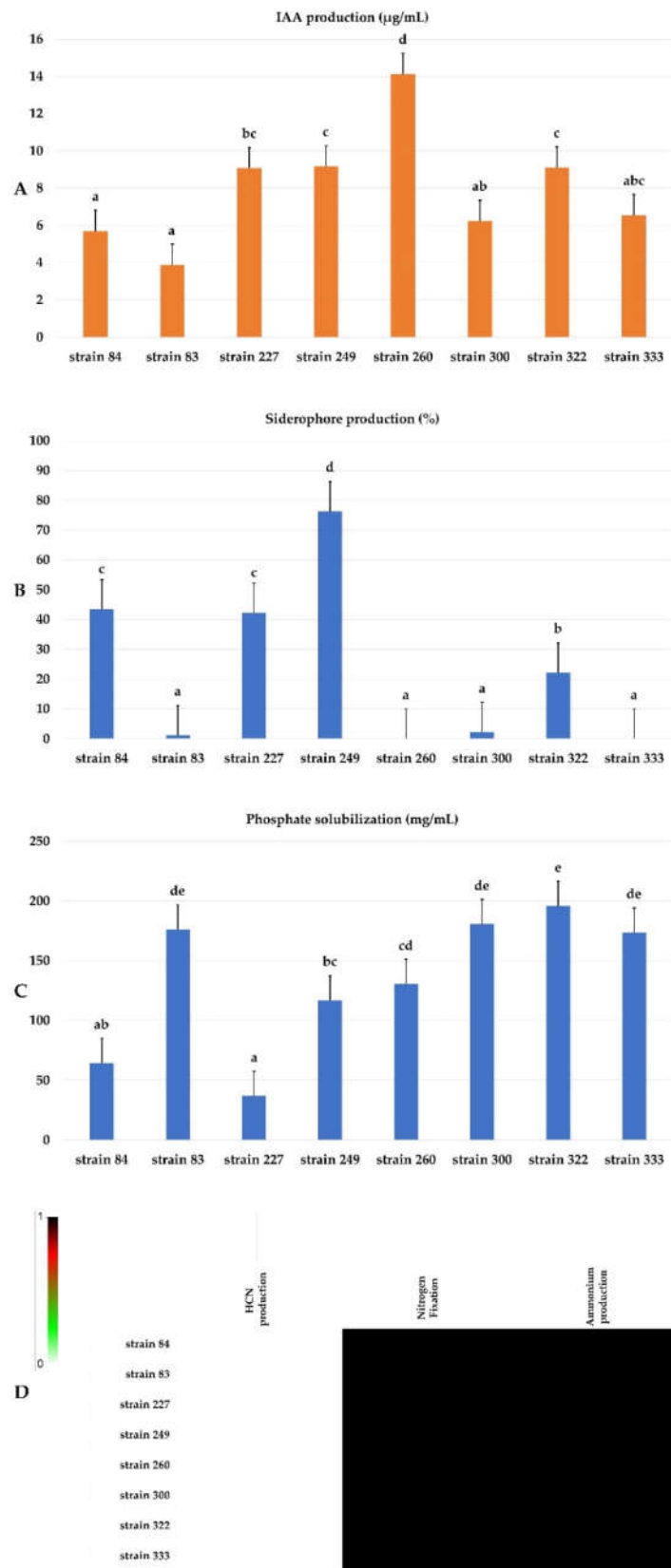


Figure 12. PGP activities of the different bacterial strains. (A) Production of IAA ($\mu\text{g/mL}$), (B) Production of siderophores (%), and (C) Solubilization of phosphates (mg/mL). The data present the

means \pm the standard error. Different letters between bars in each group indicate a significant difference at ($p < 0.05$) determined by ANOVA with the comparison of means using Tukey's HSD. (D) HCN production, nitrogen fixation, and NH_3 production.

3.11. Production of Hydrolytic Enzymes

The enzymatic activity was detected by measuring the production of halos around the bacterial colonies (Figure 13). The results showed that the enzyme produced by all the strains was chitinase. The ability to produce other enzymes, amylase, cellulase, xylanase, esterase, and pectinase, was a property common to all isolates. Nevertheless, some strains (83, 300, and 322) failed to produce protease.

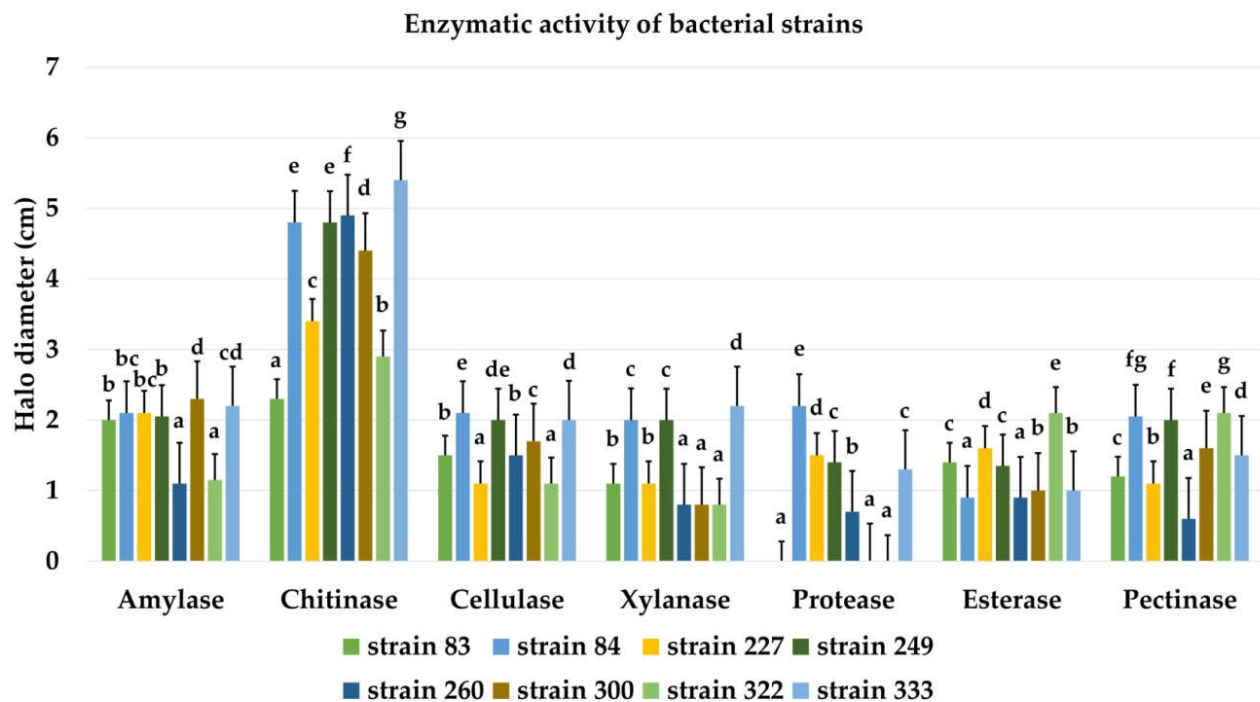


Figure 13. Production of hydrolytic enzymes by bacterial strains. The data present the means \pm the standard error. Different letters between bars in each group indicate a significant difference at ($p < 0.05$) determined by ANOVA with the comparison of means using Tukey's HSD.

4. Discussion

The vascular wilt of date palm, also known as Bayoud, caused by FOA is the most destructive disease in North Africa and has no effective control strategy. Since its appearance, this disease has caused enormous economic losses due to the decline in crop yield and quality. Given the disadvantages of chemical control, biological control remains the most effective means. The use of microorganisms is one of the most promising biological control methods for suppressing plant diseases. In any ecosystem, the host-microbiota interaction is an established concept. This microbial symbiotic relationship plays an important role in plant growth control and disease resistance. Therefore, the study of microflora associated with date palms is necessary to identify the beneficial agents important in preventing pathogen infections and that contribute to the growth of high-quality disease-free cultivars.

This study aimed to screen the antagonistic bacterial species of FOA. Therefore, the exploration of epidemic foci in the palm groves of the M'zab valley, being the front of the progression of Bayoud for more than 40 years, constituted the sampling sites. Two sites

were chosen, El-Atteuf and Metlili, for the isolation of bacterial strains from healthy and infected rhizospheric soil, non-rhizospheric soil (between palm trees), and the roots of healthy and infected palm trees. A significant number of bacteria were bound to the rhizosphere which represents the main location for nutrient uptake [56]. In this environment, plant roots provide soil microorganisms with root exudates that are used as substrates and signaling molecules. These molecules mediate interactions between plant roots and microbial communities in the rhizosphere [57]. Isolates ($n = 335$) recovered from these two sites were screened for their inhibitory effect against FOA using in vitro confrontation tests. The rates of active isolates were 19.84%, 26.37%, 17.74%, 27.27%, and 26.08% coming, respectively, from healthy rhizospheric soil, infected, non-rhizospheric soil, and healthy and infected roots. These levels indicated that the number of antagonistic endophytic and rhizospheric bacteria was higher than that of non-rhizospheric bacteria. This can be explained by the root surface and the root system being colonized by a wide range of soil bacteria capable of stimulating plant growth and health [58]. Certain endophytic bacteria colonizing an ecological niche make them suitable as biological control agents [56]. Biological control agents may have a better chance of becoming established and effectively controlling pathogens if they originate from the soil, compared to exotic microorganisms, because these type of native microorganisms are already adapted to the local climate and edaphic conditions as well as to the soil microbiota [59]. It has also been suggested that diseased date palm endophytes represent an interesting niche of endophytes capable of controlling a wide range of plant pathogens [60].

The screening yielded eight bacterial isolates with strong activity against FOAs. In our study, we selected the bacterial strains according to the sampling compartment. These strains tested against other strains of FOA have shown that they have inhibitory action against the fungi tested. This makes it possible to confirm their antagonistic character towards the strains of FOA. Similar results were observed by Slama et al. [23] where the screening of four bacterial isolates designated BFOA1, BFOA2, BFOA3, and BFOA4, were found to be highly active against FOA LMA1. These bacteria were found to be effective in inhibiting other strains of FOA [61]. The percentage of inhibition of FOA was approximately 55%. A similar result was found in our experiments and the maximum inhibition rate of 52.94% was observed for strain 333 against FOA5. Other authors have also proven the antifungal efficacy of two strains of *Bacillus amyloliquefaciens* Ag1 and *Burkholderia cepacia* Cs5 against FOA with maximum inhibition rates of 75% and 83%, respectively [62]. It has been proven that certain microorganisms such as *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., species of actinomycetes, and *Aspergillus* spp. Isolated from the rhizosphere of the date palm are antagonists of the FOA growth, thus offering protection to date palms against the Bayoud disease [63]. In addition, the bacterial isolates showed inhibitory activity against four other major plant pathogens (Aa, Fg, Fs, and Pi) also infecting other crops planted in the same oasis ecosystems exploited in this study. Due to their biocontrol potential, these strains can be used as biological control agents against many phytopathogens [64–66].

The phylogenetic identification of bacterial strains by 16S-DNA sequencing revealed that all strains phylogenetically belong to the *Bacillus* species (*Bacillus* sp.; *B. subtilis*; *B. atrophaeus*; *B. halotolerans*; *B. amyloliquefaciens*, and *B. paralicheniformis*). *Bacillus* species have a wide range of biocontrol activities against various plant pathogens [23,67–69] through the formation of endospores [70,71] which allows them to survive in stressful conditions [35,72]. Currently, several species of the *Bacillus* genus (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, and *B. pumilus*) have been widely studied to mitigate the incidence of agricultural diseases [73–75]. They have been identified as biocontrol agents and are considered good candidates for biological control [76] and prevent the establishment and development of plant pathogens by different mechanisms [77,78].

In order to obtain an eventual synergistic antagonism towards FOA, the co-culture of the bacterial strains was carried out. The association of biocontrol agents is sometimes necessary to increase their ability to suppress multiple pathogens [79]. Inhibition rates of

the combined strains recorded a maximum of 58.77%. In comparison to the antifungal activity of bacteria in monoculture and co-culture, no significant difference was reported. However, the mixture of biocontrol agents may result in increased, decreased, or similar effects of pathogen suppression [80]. Moreover, new studies have proven that compatibility and taxonomic diversity are the two main factors responsible for the success of the combination between several strains of biocontrol agents [81,82]. Compatibility is defined as the possibility of growing in co-culture in vitro without one inhibiting the growth of the other [83]. Moreover, combining biocontrol agents with taxonomic distance seems desirable because the amount and number of secondary metabolites that inhibit pathogen growth increase with increasing taxonomic diversity [81]. The bacterial strains of the present study are compatible, but all belong to the same genus *Bacillus*. Indeed, the lack of taxonomic diversity between these bacterial strains during the combination may explain the lack of improvement in inhibition rates.

The production of metabolites by antagonistic bacteria is essential to help the plant fight against fungal diseases by interfering with the growth and activities of pathogens. The suppression of pathogens is based on the synthesis of antibiotics, antimicrobial peptides, bacteriocins, toxins, and lytic enzymes [84,85]. The antifungal effect of bacterial supernatants, alone or combined in vitro, showed inhibitory activity on the growth of FOA. Several supernatants obtained from *Bacillus* species have demonstrated activity against pathogens. However, our results showed that the inhibition percentages of the bacterial supernatants alone (strains 333, 84, and 249) and their combinations were close. This proves that there is no synergistic or additive effect between the different bacterial supernatants. Indeed, the inhibition capacity of supernatants with their metabolites is linked to the presence of lipopeptides, including iturins, fengycins, surfactins, and sphingofungins [65,86]. The success of the combination of bacteria in biocontrol is conditioned when the individual strains exert complementary mechanisms of disease suppression [85]; when one mechanism is ineffective in particular conditions, the others can compensate for it. Thus, the combination of strains with different modes of action can increase the possibility of building an effective and consistent defense against plant pathogens [87]. Nevertheless, the combination of biocontrol agents may give undesirable results in increased plant pathogen inhibition compared to the use of the most effective component by a biocontrol strain alone [88].

In addition to diffusible metabolites, volatile organic compounds (VOCs) are also used in the suppression of many plant pathogens [89]. The antifungal effect of the VOCs emitted by the bacterial strains towards FOA revealed very low inhibition rates. Only strain 260 displayed an average inhibition rate of 28.89%. Studies have found that the inhibition by VOCs varies widely between fungal species. According to the results obtained by Che et al. [90], the volatiles of *Lysinibacillus* sp. FJAT-4748 did not affect the growth of all pathogenic fungi in the same way. The observed differences in fungal sensitivities to bacterial VOCs may be explained by differences in physiological and pathogenicity properties. VOCs produced by the *Bacillus* genus depend on the growth of the fungi and also on the nature of the pathogenic fungi against which the VOCs were tested [91]. However, the nature of the VOCs also varies according to the biocontrol strains. Four volatile substances identified (methyl isobutyl ketone, ethanol, 5-methyl-2-heptanone, and S-(-)-2-methylbutylamine) produced by *B. pumilus* TM-R are responsible for the inhibition of *F. oxysporum* and other phytopathogenic fungi [92]. Among the VOCs detected in *B. licheniformis*, 3-methyl-1-butanol was the most abundant compound responsible for the inhibition of mycotoxic fungi [33]. Ngo et al. [93] described that *B. amyloliquefaciens* NJN-6 was able to produce 11 VOCs and inhibit the growth of *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

To evaluate the biocontrol effect in vivo, the bacterial strains were tested on germinated date palm seeds infected with FOA. The majority of strains tested showed mild to moderate fungistatic effects. However, treatment with strain 260 significantly reduced the infection rate to 15% and the size of the necrosis. Several authors have wondered whether the in vitro selection of biocontrol agents guarantees success in planta. However, in planta

experiments have shown that strains with better antifungal activities in vitro do not always perform well in vivo and vice versa [94]. Indeed, some strains such as 260 showed satisfactory biocontrol results on palm seeds but its antagonism towards FOA in vitro was limited (low inhibition rate). Bacterial strains that show better inhibitory activity in vitro are not always effective in vivo. As in our case, strain 333 isolated from non-rhizospheric soil showed significant inhibition rates in vitro but a low ability to protect palm seeds against FOA. This can be explained by insufficient colonization of the roots of the palm unlike the endophyte strain 260 characterized by its competitive capacity of colonization, thus presenting better results of biocontrol in vivo. The results of the present study are in agreement with those obtained by Dihazi et al. [63] who proved that the pre-treatment of date palm roots with the two strains of *B. amyloliquefaciens* Ag and *Burkholderia cepacia* Cs significantly reduced the size of the browning zone around the FOA inoculation site, leading to localized necrosis. When necrosis formed disease symptoms were reduced, plants were more resistant to Bayoud disease. Biocontrol is mainly explained by several mechanisms of action that act alone or together to give the plant better resistance to disease: competition for space and nutrients, production of inhibiting substances (lipopeptides, antibiotics, volatile compounds, lytic enzymes, etc.), and induced systemic resistance.

Competition for niches and nutrients is an aspect involved by bacteria in biological control [95]. Indeed, their ability to colonize roots is the first fundamental step in protecting plants against plant pathogens. The root system is a nutrient-rich niche that serves as a chemoattractant for microbial colonization [96]. However, the competence and/or colonization of bacteria is mainly linked to their ability to take advantage of and adapt to a specific environment [77]. The process of colonization is based on the attachment and establishment of the bacteria on the root and the use of these plant nutrients [97]. Studies have proven that the protection of the date palm against *Fusarium* wilt by endo-rhizospheric strains is linked much more to the capacity of root colonization than to a phenomenon of antibiosis. The performance of bacterial strains is linked to their rapid growth and their fairly high root colonization power, which allows them to be competitive for nutrient sources and thus occupy root sites before the pathogen [98].

In addition, *Bacillus* spp. are among the most studied rhizobacteria that trigger ISR in plants [99]. Through the induction of hormone regulatory networks, bacteria can rapidly trigger plant defense responses when attacked by a pathogen [33]. Both rhizospheric and endophytic bacteria promote ISR in plants through the production of various metabolites such as antibiotics, siderophores, volatile organic compounds (VOCs), and others considered as ISR elicitors [38]. Bacteria-triggered ISR has been reported to start at the root and then spread to other parts of the plant [100]. ISR caused by *B. subtilis* results in changes in the host cell wall composition, production of pathogenesis-related (PR) proteins, such as chitinases and glucanases, and synthesis of phytoalexins host resistance against pathogens. In addition, ISR activates antioxidant enzymes that are responsible for the elimination of ROS [101]. Recent studies have clearly shown the potential of *B. paralicheniformis* in activating antioxidant defense enzymes in tomato plants infected with *F. oxysporum* and preventing oxidative damage through hydroxyl radical scavenging activities by suppressing the appearance of vascular wilt disease [67]. Furthermore, the transcriptome sequencing performed by Jiang et al. [102] revealed that nearly a thousand differentially expressed genes were linked to the process of triggering ISR by *B. velezensis* F21 against *F. oxysporum* f. sp. *niveum* (Fon), the causative agent of the vascular wilt of watermelon.

These particular biocontrol agents are used not only to replace chemical pesticides but to improve plant growth and attenuate various natural environmental stresses (salinity, aridity, extreme temperatures and pH, et or stresses related to environmental contamination). Members of the *Bacillus* genus are the most important PGPBs that have unique characteristics as biopesticides, biofertilizers, and bio-remediators.

The PGP potential of the selected strains was evaluated in vitro. All isolates showed nitrogen-fixing abilities. The production of IAA and the solubilization of phosphates were

common traits in all bacterial strains. IAA is one of the most important phytohormones and is considered a signal molecule in the regulation of plant development [103]. On the other hand, the ability of PGPRs to solubilize phosphate (P) has various physiological functions related to plant health and resistance to biotic and abiotic stresses [104]. Our study indicated that the majority of strains produced siderophores, with the exception of strains 333 and 83. Siderophores act as specific ferric iron chelating agents. Some PGPR improve plant growth by producing extracellular siderophores which help control several plant diseases [83]. Thus, low levels of iron prevent plant pathogens from proliferating in the root zone of the plant. In contrast, plants can use this siderophore-iron complex for their nutrition [105,106]. All isolates showed nitrogen fixation and NH_3 production and failed to produce HCN. Ammonia production can satisfy the nitrogen demand of host plants and promote root elongation and root biomass. When produced in excess, it can also provide defense against plant pathogens by reducing their colonization in host plants [107]. On the other hand, hydrocyanic acid (HCN) is known for its toxicity against plant pathogens and the chelation of metal ions [108]. All these PGP activities are characteristic of biocontrol bacteria [59].

Hydrolytic enzymes play a very important role in the biocontrol of plant pathogens. Many rhizobacteria and biological control agents synthesize extracellular hydrolytic enzymes involved in the hydrolysis of fungal cell wall components such as chitin, proteins, and cellulose [109]. These enzymes also prevent fungal spore germination and contribute to protein breakdown [106]. According to the results, the different enzymes amylase, chitinase, cellulase, xylanase, protease, esterase, and pectinase were produced, with chitinase as the most abundant. Microbial chitinase deteriorates and destroys the cell walls of many parasites and pathogens [110]. It has been reported that the antifungal effect of *B. subtilis* on the thinning of fungal hyphae is related to the secretion of chitinase and glucanase [21]. Several authors have demonstrated that *Bacillus* sp. inhibits the mycelial growth of phytopathogenic fungi by attaching to their cell walls and releasing lytic enzymes (chitinase, protease, and cellulase), siderophores, and HCN. Therefore, these antifungal compounds cause cracks and deformation in hyphae, which leads to impaired cellular structure and functions due to vacuolation and leakage of protoplasts [111].

The survival of a strain introduced into the rhizosphere is affected by a number of abiotic factors. In contrast, stress-tolerant strains can be effectively involved in extreme environments where they can show better competence in the rhizosphere and better competitive ability [112–114]. The tolerance of bacterial strains to different abiotic stresses was also examined in our study. The results showed that the majority of strains grew at concentrations of 400 mM NaCl and 10% PEG. Additionally, some strains tolerate up to 1200 mM NaCl and 20% PEG. Thus, all strains have shown growth capacity at high pH values (pH 9 and 11) and can withstand temperatures up to 50 °C [22,115]. The bacterial strains also exhibited resistance to different concentrations of heavy metals. Some strains were able to withstand up to 500 ppm mercury, 1000 ppm lead, and 500 ppm cobalt. Nevertheless, most managed to grow at 100 ppm cadmium. This tolerance is explained by several resistance mechanisms observed by PGPRs [116]. PGPRs reduce heavy metal toxicity by improving crop growth in polluted soil conditions [117] or when irrigating with waters containing high levels of heavy metals [23]. *Bacillus licheniformis* has been shown to enhance the accumulation and distribution of Cd, Cr, Pb, Cu, and Zn in plants grown in soil contaminated with heavy metals, resulting in reduced levels of toxic metals in soil [111].

5. Conclusions

The use of antagonistic bacteria to control the *Fusarium* wilt of the date palm is currently a major challenge. The choice of bacteria antagonists of the pathogenic agent is a very important criterion. Eight rhizospheric and endophytes *Bacillus* species showed their innate potential for biocontrol and biofertilization. These strains have shown the ability to produce a range of diffusible or volatile antifungal metabolites, cell wall degrading enzymes, and plant growth-promoting compounds. The in vivo study of the bio-control

assay showed that the in vitro selection of biocontrol agents is not correlated with the disease-suppressing activity in vivo. The antagonistic activity and efficacy of any bio-control agent depend critically on the combination of different competitive and antibiosis mechanisms inducing systemic resistance in plants. Therefore, these isolates are worthy of further evaluation under field conditions. The genus *Bacillus*, according to its physiological and metabolic properties, meets these requirements to become an effective commercial biological control product. This is supported by various studies conducted to assess the performance of *Bacillus* in controlling plant diseases. Further work will be carried out to validate the results in the field and future research will target the possibility of developing appropriate formulation and application techniques to ensure or enhance date palm resistance against FOA.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/agronomy12102403/s1>, Table S1: Bacterial strains activity against *Fusarium albedinis* FOA.

Author Contributions: Conceptualization, S.B., H.C.-S. N.S., and L.B.; methodology, S.B., A.S., H.C.-S., N.S., and L.B.; software, A.C.B., A.S., H.C.-S., and L.B.; validation, H.C.-S., A.S., L.L., and L.B.; formal analysis, A.C.B. and L.B.; investigation, S.B., H.C.-S., A.S., L.L., and L.B.; resources, H.C.-S., A.S., L.L., and L.B.; data curation, S.B., A.C.B., N.S., and L.B.; writing—original draft preparation, S.B., H.C.-S., A.S., N.S., and L.B.; writing—review and editing, A.C.B., L.L., and F.N.A.; visualization, L.L., F.N.A., A.C.B., and L.B.; supervision, H.C.-S., A.S., and L.B.; project administration, H.C.-S., A.S., and L.B.; and funding acquisition, H.C.-S., A.S., L.L., and L.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Djerbi, M. *Précis de Phéniciculture*. ED.; FAO: Rome, Italy, 1994; p. 192.
2. Hassan, M.M.; Allam, M.A.; Shams El-Din, I.M.; Malhat, M.H.; Taha, R.A. High-frequency direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from date palm immature inflorescences using picloram. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **2021**, *19*, 1–11.
3. De la Perrière, R.B.; Amir, H.; Bounaga, N. Prospects for integrated control of ‘bayoud’ (*Fusarium* wilt of the date palm) in Algerian plantations. *Crop Protect.* **1995**, *14*, 227–235.
4. Sidky, R. Optimized direct organogenesis from shoot tip explants of date palm. In *Date Palm Biotechnology Protocols*; Humana Press: New York, NY, USA, 2017; Volume 1, pp. 37–45.
5. FAOSTAT. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed on 20 February 2020).
6. Al-Sharidah, A. Report of Black Scorch Disease on Date Palm Trees in the State of Kuwait. *Am. Acad. Sci. Res. J. Eng. Technol. Sci.* **2017**, *28*, 14–17.
7. Abedalred, E.M.; Ismail, W.M.; Abdulmoohsin, R.G.; Al-Karhi, M.A. First molecular identification of *Fusarium fujikuroi* causing pollen rot of palm trees (*Phoenix dactylifera* L.) in Iraq and evaluation efficacy of some nanoparticles against it. In Proceedings of the IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Bristol, UK, 1 November 2019.
8. Armstrong, G.M.; Armstrong, J.R. Forms specials and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*; Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Cook, R.J., Eds.; The Pennsylvania States University Press: University Park, PA, USA, 1981; pp. 391–393.
9. Ahmed, Y.; Hussien, A.; El-badry, N.; Soliman, M.S. Validation of a Diagnostic Protocol for the Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, the Causal Agent of Bayoud Disease of Date Palm. *Egypt. J. Phytopathol.* **2019**, *47*, 297–312.
10. OEPP/EPP. Fiches informatives sur les organismes de quarantaine n 70, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Bulletin* **1982**, *12*. <https://gd.eppo.int/taxon/FUSAAL/datasheet> (accessed on 6 December 2017)
11. Bahriz, H.; Bouras, N. Etude de la Maladie du Bayoud, le Comportement Variétal du Palmier Dattier vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* dans la Vallée du M’Zab. *Afr. Rev. Sci. Technol. Develop.* **2020**, *5*, 41–60.
12. EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), online. EPPO Global Database. Available online: <https://gd.eppo.int> (accessed on 6 December 2017).

13. Bouhlali, E.D.T.; Derouich, M.; Ben-Amar, H.; Meziani, R.; Essarioui, A. Exploring the potential of using bioactive plant products in the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. albedinis: The causal agent of Bayoud disease on date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Beni-Seuf. Univ. J. Appl. Sci.* **2020**, *9*, 1–9.
14. Djerbi, M. *Diseases of the Palm Phoenix Dactylifera*; FAO: Baghdad, Iraq, 1983; p. 45.
15. Benzohra, I.E.; Megateli, M.; Elayachi, B.A.; Zekraoui, M.; Djillali, K.; Bouafia, A.; Benouis, S.; Benaziza, A.; Rekis, A. Integrated management of Bayoud disease on date palm (*Phoenix dactylifera* L.) caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. albedinis in Algeria. *JARA* **2017**, *14*, 93–100.
16. Djerbi, M. *Les Maladies du Palmier Dattier. Projet Régional de Lutte Contre le Bayoud*; FAO: Alger, Algeria, 1988; p. 127.
17. EPPO. EPPO Standards. Diagnostic protocols for regulated pests PM 7/16 *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* **2003**, *33*, 245–247.
18. EFSA Panel on Plant Health (PLH); Jeger, M.; Bragard, C.; Caffier, D.; Candresse, T.; Chatzivassiliou, E.; Dehnen-Schmutz, K.; Gilioli, G.; Grégoire, J.C.; Jaques Miret, J.A.; et al. Pest categorisation of *Fusarium oxysporum* f.sp. albedinis. *EFSA J.* **2018**, *16*, e05183.
19. Kaddouri, Y.; Abrigach, F.; Ouahhoud, S.; Benabbes, R.; El Kodadi, M.; Alsalmé, A.; Al-Zaqri, N.; Warad, I.; Touzani, R. Mono-Alkylated Ligands Based on Pyrazole and Triazole Derivatives Tested Against *Fusarium oxysporum* f.sp. albedinis: Synthesis, Characterization, DFT, and Phytase Binding Site Identification Using Blind Docking/Virtual Screening for Potent Fophy Inhibitors. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 559262. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.559262>.
20. De Lamo, F.J.; Takken, F.L. Biocontrol by *Fusarium oxysporum* using endophyte-mediated resistance. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 37.
21. Khan, N.; Martínez-Hidalgo, P.; Ice, T.A.; Maymon, M.; Humm, E.A.; Nejat, N.; Sanders, E.R.; Kaplan, D.; Hirsch, A.M. Anti-fungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2363. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02363>.
22. Sedra, M.H. *La Maladie du Bayoud du Palmier Dattier en Afrique du Nord: Diagnostic et Caractérisation*; Actes du Symposium International sur le Développement durable des Systèmes Oasiens: Erfoud, Marocco, 2005.
23. Slama, H.B.; Cherif-Silini, H.; Chenari Bouket, A.; Qader, M.; Silini, A.; Yahiaoui, B.; Alenezi, F.N.; Luptakova, L.; Triki, M.A.; Vallat, A.; et al. Screening for *Fusarium* antagonistic bacteria from contrasting niches designated the endophyte *Bacillus halotolerans* as plant warden against *Fusarium*. *Front. Microbiol.* **2019**, *9*, 3236. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03236>.
24. Slama, H.B.; Cherif-Silini, H.; Chenari Bouket, A.; Silini, A.; Alenezi, F.N.; Luptakova, L.; Vallat, A.; Belbahri, L. Biotechnology and bioinformatics of endophytes in biocontrol, Bioremediation, and plant growth promotion. In *Endophytes: Mineral Nutrient Management*; Maheshwari, D.K., Dheeman, S., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2021; Volume 3, pp. 181–205. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65447-4_8.
25. Cherif-Silini, H.; Thissera, B.; Chenari Bouket, A.; Saadaoui, N.; Silini, A.; Eshelli, M.; Alenezi, F.N.; Vallat, A.; Luptakova, L.; Yahiaoui, B.; et al. Durum wheat stress tolerance induced by endophyte *Pantoea agglomerans* with genes contributing to plant functions and secondary metabolite arsenal. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3989. <https://doi.org/10.3390/ijms20163989>.
26. Mefteh, F.B.; Daoud, A.; Chenari Bouket, A.; Thissera, B.; Kadri, Y.; Cherif-Silini, H.; Eshelli, M.; Alenezi, F.N.; Vallat, A.; Oszako, T.; et al. Date Palm Trees Root-Derived Endophytes as Fungal Cell Factories for Diverse Bioactive Metabolites. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1986. <https://doi.org/10.3390/ijms19071986>.
27. Díaz-Valle, A.; López-Calleja, A.C.; Alvarez-Venegas, R. Enhancement of pathogen resistance in common bean plants by inoculation with *Rhizobium etli*. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 1317. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01317>.
28. Alenezi, F.N.; Chenari Bouket, A.; Cherif-Silini, H.; Silini, A.; Jaspars, M.; Oszako, T.; Belbahri, L. Loss of Gramicidin Biosynthesis in Gram-Positive Biocontrol Bacterium *Aneurimibacillus migulanus* (Takagi *et al.*, 1993) Shida *et al.* 1996 Emend Heyndrickx *et al.*, 1997 Nagano Impairs Its Biological Control Ability of *Phytophthora*. *Forests* **2022**, *13*, 535.
29. Cherif-Silini, H.; Silini, A.; Chenari Bouket, A.; Alenezi, F.N.; Luptakova, L.; Bouremani, N.; Nowakowska, J.A.; Oszako, T.; Belbahri, L. Tailoring next generation plant growth promoting microorganisms as versatile tools beyond soil desalinization: A road map towards field application. *Sustainability* **2021**, *13*, 4422. <https://doi.org/10.3390/su13084422>.
30. Pliego, C.; Ramos, C.; de Vicente, A.; Cazorla, F.M. Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant Soil.* **2011**, *340*, 505–520.
31. Knudsen, I.M.B.; Hockenhull, J.; Jensen, D.F.; Gerhardson, B.; Hökeberg, M.; Tahvonen, R.; Teperi, E.; Sundheim, L.; Henriksen, B. Selection of biological control agents for controlling soil and seed-borne diseases in the field. *Eur. J. Plant Pathol.* **1997**, *103*, 775–784. <https://doi.org/10.1023/A:1008662313042>.
32. Daayf, F.; Adam, L.; Fernando, W.G.D. Comparative screening of bacteria for biocontrol of potato late blight (strain US-8), using in-vitro, detached-leaves, and whole plant testing systems. *Can. J. Plant Pathol.* **2003**, *25*, 276–284.
33. Besset-Manzoni, Y.; Joly, P.; Brutel, A.; Gerin, F.; Soudiere, O.; Langin, T.; Prigent-Combaret, C. Does in vitro selection of biocontrol agents guarantee success in planta? A study case of wheat protection against *Fusarium* seedling blight by soil bacteria. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0225655. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225655>.
34. Cherif-Silini, H.; Silini, A.; Yahiaoui, B.; Ouzari, I.; Boudabous, A. Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of *Bacillus* isolated from the wheat rhizosphere. *Ann. Microbiol.* **2016**, *66*, 1087–1097.

35. Kerbab, S.; Silini, A.; Chenari Bouket, A.; Cherif-Silini, H.; Eshelli, M.; El Houda Rabhi, N.; Belbahri, L. Mitigation of NaCl stress in wheat by rhizosphere engineering using salt habitat adapted PGPR halotolerant bacteria. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 1034. <https://doi.org/10.3390/app11031034>.
36. Rabhi, N.E.H.; Cherif-Silini, H.; Silini, A.; Alenezi, F.N.; Chenari Bouket, A.; Oszako, T.; Belbahri, L. Alleviation of Salt Stress via Habitat-Adapted Symbiosis. *Forests* **2022**, *13*, 586.
37. Shao, J.; Liu, Y.; Xie, J.; Stefanic, P.; Lv, Y.; Fan, B.; Mandic-Mulec, I.; Zhang, R.; Shen, Q.; Xu, Z. Annulment of Bacterial Antagonism Improves Plant Beneficial Activity of a *Bacillus velezensis* Consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **2022**, *88*, e0024022. <https://doi.org/10.1128/aem.00240-22>.
38. Borriss, R. *Bacillus*, A Plant-Beneficial Bacterium. In *Principles of Plant-Microbe Interactions*; Lugtenberg, B., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_40.
39. Mac Faddin, J.F. *Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria*; Williams and Wilkins: Baltimore, MD, USA, 1985; volume 1.
40. King, E.O.; Ward, M.; Raney, D.E.J. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Lab. Clin. Méd.* **1954**, *44*, 301.
41. Palumbo, J.D.; O'Keeffe, T.L. Method for high-throughput antifungal activity screening of bacterial strain libraries. *J. Microbiol. Methods* **2021**, *189*, 106311. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106311>.
42. Luchi, N.; Ghelardini, L.; Belbahri, L.; Quartier, M.; Santini, A. Rapid detection of *Ceratomyces platani* inoculum by quantitative Real-Time PCR assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 5394–5404. <https://doi.org/10.1128/AEM.01484-13>.
43. Mefteh, F.B.; Chenari Bouket, A.; Daoud, A.; Luptakova, L.; Alenezi, F.N.; Gharsallah, N.; Belbahri, L. Metagenomic insights and genomic analysis of phosphogypsum and its associated plant endophytic microbiomes reveals valuable actors for waste bioremediation. *Microorganisms* **2019**, *7*, 382. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100382>.
44. Li, T.; Tang, J.; Karuppiyah, V.; Li, Y.; Xu, N.; Chen, J. Co-culture of *Trichoderma atroviride* SG3403 and *Bacillus subtilis* 22 improves the production of antifungal secondary metabolites. *Biol. Control* **2019**, *140*, 104122. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104122>.
45. Dutta, S.; Woo, E.E.; Yu, S.M.; Nagendran, R.; Yun, B.S.; Lee, Y.H. Control of anthracnose and gray mold in pepper plants using culture extract of white-rot fungus and active compound schizostatin. *Mycobiology* **2019**, *47*, 87–96.
46. He, C.N.; Ye, W.Q.; Zhu, Y.Y.; Zhou, W.W. Antifungal activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus methylotrophicus* and *Bacillus thuringiensis* against five common spoilage fungi on loquats. *Molecules* **2020**, *25*, 3360.
47. Yu, X.; Li, Y.; Zhang, C.; Liu, H.; Liu, J.; Zheng, W.; Kang, X.; Leng, X.; Zhao, K.; Gu, Y. Culturable heavy metal-resistant and plant growth promoting bacteria in V-Ti magnetite mine tailing soil from Panzhihua, China. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e106618.
48. Patten, C.L.; Glick, B.R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3795–3801.
49. Olsen, R.S.; Sommers, L.E. Phosphorus. In *Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Properties*, 2nd Ed.; Pages, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R., Eds. American Society of Agronomy: Madison, WI, USA, 1982; pp. 403–430.
50. Schwyn, B.; Neilands, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **1987**, *160*, 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9).
51. Gokarn, K. Comments: Siderophore production by uropathogenic *Escherichia coli*. *Indian J. Pathol. Microbiol.* **2010**, *53*, 570–570.
52. Cappuccino, J.C.; Sherman, N. *Microbiology: A Laboratory Manual*, 3rd Ed.; Benjamin-Cummings Publishing Company: New York, NY, USA, 1992; pp. 125–179.
53. Lorck, H. Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiol. Plant* **1948**, *1*, 142–146. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1948.tb07118.x>.
54. Kumar, D.; Kumar, L.; Nagar, S.; Raina, C.; Parshad, R.; Gupta, V.K. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. *Arch. Appl. Sci. Res.* **2012**, *4*, 1763–1770.
55. Loper, J.E.; Schroth, M.N. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology* **1986**, *76*, 386–389. <https://doi.org/10.1094/Phyto-76-386>.
56. Hashem, A.; Tabassum, B.; Abd_Allah, E.F. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi J. Biol. Sci.* **2019**, *26*, 1291–1297.
57. Huang, X.F.; Chaparro, J.M.; Reardon, K.F.; Zhang, R.; Shen, Q.; Vivanco, J.M. Rhizosphere interactions: Root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany* **2014**, *92*, 267–275.
58. Djaya, L.; Istifadah, N.; Hartati, S.; Joni, I.M. *In vitro* study of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and endophytic bacteria antagonistic to *Ralstonia solanacearum* formulated with graphite and silica nano particles as a biocontrol delivery system (BDS). *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2019**, *19*, 101153.
59. Vinayarani, G.; Prakash, H. Growth promoting rhizospheric and endophytic bacteria from *Curcuma longa* L. as biocontrol agents against rhizome rot and leaf blight diseases. *Plant Pathol. J.* **2018**, *34*, 218.
60. Khalil, M.M.R.; Fierro-Coronado, R.A.; Peñuelas-Rubio, O.; Villa-Lerma, A.G.; Plascencia-Jatomea, R.; Félix-Gastélum, R.; Maldonado-Mendoza, I.E. Rhizospheric bacteria as potential biocontrol agents against *Fusarium* wilt and crown and root rot diseases in tomato. *Saudi J. Biol. Sci.* **2021**, *28*, 7460–7471.

61. Cheffi, M.; Chenari Bouket, A.; Alenezi, F.N.; Luptakova, L.; Belka, M.; Vallat, A.; Rateb, M.E.; Tounsi, S.; Triki, M.A.; Belbahri, L. *Olea europaea* L. root endophyte *Bacillus velezensis* OEE1 counteracts oomycete and fungal harmful pathogens and harbours a large repertoire of secreted and volatile metabolites and beneficial functional genes. *Microorganisms* **2019**, *7*, 314. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090314>.
62. Bernal, P.; Allsopp, L.P.; Filloux, A.; Llamas, M.A. The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens. *ISME J.* **2017**, *11*, 972–987. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.169>.
63. Dihazi, A.; Jaiti, F.; Jaoua, S.; Driouich, A.; Baaziz, M.; Daayf, F.; Serghini, M.A. Use of two bacteria for biological control of bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* **2012**, *55*, 7–15.
64. Nishad, R.; Ahmed, T.A. Survey and identification of date palm pathogens and indigenous biocontrol agents. *Plant Dis.* **2020**, *104*, 2498–2508.
65. Pellegrini, M.; Pagnani, G.; Bernardi, M.; Mattedi, A.; Spera, D.M.; Gallo, M.D. Cell-free supernatants of plant growth-promoting bacteria: A review of their use as bio-stimulant and microbial biocontrol agents in sustainable agriculture. *Sustainability* **2020**, *12*, 9917.
66. Hong, S.; Kim, T.Y.; Won, S.-J.; Moon, J.-H.; Ajuna, H.B.; Kim, K.Y.; Ahn, Y.S. Control of Fungal Diseases and Fruit Yield Improvement of Strawberry Using *Bacillus velezensis* CE 100. *Microorganisms* **2022**, *10*, 365. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020365>.
67. Jinal, H.N.; Sakthivel, K.; Amaresan, N. Characterization of antagonistic *Bacillus paralicheniformis* (strain EAL) by LC–MS, antimicrobial peptide genes, and ISR determinants. *Antonie Leeuwenhoek.* **2020**, *113*, 1167–1177.
68. Slama, H.B.; Triki, M.A.; Chenari Bouket, A.; Mefteh, F.B.; Alenezi, F.N.; Luptakova, L.; Cherif-Silini, H.; Vallat, A.; Oszako, T.; Gharsallah, N.; et al. Screening of the high-rhizosphere competent *Limoniastrum monopetalum*’culturable endophyte microbiota allows the recovery of multifaceted and versatile biocontrol agents. *Microorganisms* **2019**, *7*, 249.
69. Chen, K.; Tian, Z.; He, H.; Long, C.A.; Jiang, F. *Bacillus* species as potential biocontrol agents against citrus diseases. *Biol. Control* **2020**, *151*, 104419.
70. Secaira-Morocho, H.; Castillo, J.A.; Driks, A. Diversity and evolutionary dynamics of spore-coat proteins in spore-forming species of Bacillales. *Microb. Genom.* **2020**, *6*, mgen000451. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000451>.
71. Ahmed, H.F.A.; Seleiman, M.F.; Al-Saif, A.M.; Alshiekheid, M.A.; Battaglia, M.L.; Taha, R.S. Biological Control of Celery Powdery Mildew Disease Caused by *Erysiphe heraclei* DC *In Vitro* and *In Vivo* Conditions. *Plants* **2021**, *10*, 2342. <https://doi.org/10.3390/plants10112342>.
72. Belbahri, L.; Chenari Bouket, A.; Rekik, I.; Alenezi, F.N.; Vallat, A.; Luptakova, L.; Petrovova, E.; Oszako, T.; Cherrad, S.; Vacher, S.; et al. Comparative genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* strains reveals a core genome with traits for habitat adaptation and a secondary metabolites rich accessory genome. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1438. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01438>.
73. Attia, M.S.; El-Sayyad, G.S.; Abd Elkodous, M.; El-Batal, A.I. The effective antagonistic potential of plant growth-promoting rhizobacteria against *Alternaria solani*-causing early blight disease in tomato plant. *Sci. Hort.* **2020**, *266*, 109289.
74. Hong, P.; Hao, W.; Luo, J.; Chen, S.; Hu, M.; Zhong, G. Combination of hot water, *Bacillus amyloliquefaciens* HF-01 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest decay of mandarin fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **2014**, *88*, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.10.004>.
75. Malgioglio, G.; Rizzo, G.F.; Nigro, S.; Lefebvre du Prey, V.; Herforth-Rahmé, J.; Catara, V.; Branca, F. Plant-Microbe Interaction in Sustainable Agriculture: The Factors That May Influence the Efficacy of PGPM Application. *Sustainability* **2022**, *14*, 2253. doi:10.3390/su14042253.
76. Villarreal-Delgado, M.F.; Villa-Rodríguez, E.D.; Cira-Chávez, L.A.; Estrada-Alvarado, M.I.; Parra-Cota, F.I.; Santos-Villalobos, S.D.L. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Rev. Mex. Fitopatol.* **2018**, *36*, 95–130.
77. Balla, A.; Silini, A.; Cherif-Silini, H.; Chenari Bouket, A.; Moser, W.K.; Nowakowska, J.A.; Oszako, T.; Benia, F.; Belbahri, L. The Threat of Pests and Pathogens and the Potential for Biological Control in Forest Ecosystems. *Forests* **2021**, *12*, 1579. <https://doi.org/10.3390/f12111579>.
78. Palmieri, D.; Vitullo, D.; De Curtis, F.; Lima, G. A microbial consortium in the rhizosphere as a new biocontrol approach against *Fusarium* decline of chickpea. *Plant Soil.* **2017**, *412*, 425–439.
79. Mukherjee, A.; Chouhan, G.K.; Gaurav, A.K.; Jaiswal, D.K.; Verma, J.P. Development of indigenous microbial consortium for biocontrol management. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Verma, J.P., Gupta, V.K., Macdonald, C.A., Podile, A.R., Eds.; Elsevier: Amsterdam, Netherland, 2021; pp. 91–104.
80. Niu, B.; Wang, W.; Yuan, Z.; Sederoff, R.R.; Sederoff, H.; Chiang, V.L.; Borriss, R. Microbial interactions within multiple-strain biological control agents impact soil-borne plant disease. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 585404. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.585404>.
81. Saidi, S.; Cherif-Silini, H.; Chenari Bouket, A.; Silini, A.; Eshelli, M.; Luptakova, L.; Alenezi, F.N.; Belbahri, L. Improvement of *Medicago sativa* crops productivity by the co-inoculation of *Sinorhizobium meliloti*–actinobacteria under salt stress. *Curr. Microbiol.* **2021**, *78*, 1344–1357.

82. Thomloui, E.E.; Tsalgaidou, P.C.; Douka, D.; Spantidos, T.N.; Dimou, M.; Venieraki, A.; Katinakis, P. Multistrain versus single-strain plant growth promoting microbial inoculants-The compatibility issue. *Hell. Plant Prot. J.* **2019**, *12*, 61–77.
83. Jiao, X.; Takishita, Y.; Zhou, G.; Smith, D.L. Plant associated rhizobacteria for biocontrol and plant growth enhancement. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 634796. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634796>.
84. Alenezi, F.N.; Slama, H.B.; Chenari Bouket, A.; Cherif-Silini, H.; Silini, A.; Luptakova, L.; Nowakowska, J.A.; Oszako, T.; Belbahri, L. *Bacillus velezensis*: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal, Biocontrol and Environmental Importance. *Forests* **2021**, *12*, 1714.
85. Wang, H.; Liu, R.; You, M.P.; Barbetti, M.J.; Chen, Y. Pathogen Biocontrol Using Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPR): Role of Bacterial Diversity. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1988. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091988>.
86. Wang, X.; Liang, L.; Shao, H.; Ye, X.; Yang, X.; Chen, X.; Shi, Y.; Zhang, L.; Xu, L.; Wang, J. Isolation of the Novel Strain *Bacillus amyloliquefaciens* F9 and Identification of Lipopeptide Extract Components Responsible for Activity against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plants* **2022**, *11*, 457. <https://doi.org/10.3390/plants11030457>.
87. Ruano-Rosa, D.; Cazorla, F.M.; Bonilla, N.; Martín-Pérez, R.; De Vicente, A.; López-Herrera, C.J. Biological control of avocado white root rot with combined applications of *Trichoderma* spp. and rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **2014**, *138*, 751–762.
88. Alamri, S.; Hashem, M.; Mostafa, Y.S. *In vitro* and *in vivo* biocontrol of soil-borne phytopathogenic fungi by certain bioagents and their possible mode of action. *Biocontrol Sci.* **2012**, *17*, 155–167. <https://doi.org/10.4265/bio.17.155>.
89. Li, X.; Wang, X.; Shi, X.; Wang, B.; Li, M.; Wang, Q.; Zhang, S. Antifungal effect of volatile organic compounds from *Bacillus velezensis* CT32 against *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum*. *Processes* **2020**, *8*, 1674. <https://doi.org/10.3390/pr8121674>.
90. Che, J.; Liu, B.; Liu, G.; Chen, Q.; Lan, J. Volatile organic compounds produced by *Lysinibacillus* sp. FJAT-4748 possess antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Biocontrol Sci. Technol.* **2017**, *27*, 1349–1362.
91. Chaves-López, C.; Serio, A.; Gianotti, A.; Sacchetti, G.; Ndagijimana, M.; Ciccarone, C.; Stellarini, A.; Corsetti, A.; Paparella, A. Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. *J. Appl. Microbiol.* **2015**, *119*, 487–499.
92. Morita, T.; Tanaka, I.; Ryuda, N.; Ikari, M.; Ueno, D.; Someya, T. Antifungal spectrum characterization and identification of strong volatile organic compounds produced by *Bacillus pumilus* TM-R. *Heliyon* **2019**, *5*, e01817.
93. Ngo, T.T.; Dart, P.; Callaghan, M.; Klieve, A.; McNeill, D. Volatile Organic Compound Profiles Associated with Microbial Development in Feedlot Pellets Inoculated with *Bacillus amyloliquefaciens* H57 Probiotic. *Animals* **2021**, *11*, 3227.
94. Morales-Cedeno, L.R.; del Carmen Orozco-Mosqueda, M.; Loeza-Lara, P.D.; Parra-Cota, F.I.; de Los Santos-Villalobos, S.; Santoyo, G. Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre-and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. *Microbiol. Res.* **2021**, *242*, 126612.
95. Santhanam, R.; Menezes, R.C.; Grabe, V.; Li, D.; Baldwin, I.T.; Groten, K. A suite of complementary biocontrol traits allows a native consortium of root-associated bacteria to protect their host plant from a fungal sudden-wilt disease. *Mol. Ecol.* **2019**, *28*, 1154–1169.
96. Posada, L.F.; Álvarez, J.C.; Romero-Tabarez, M.; de-Bashan, L.; Villegas-Escobar, V. Enhanced molecular visualization of root colonization and growth promotion by *Bacillus subtilis* EA-CB0575 in different growth systems. *Microbiol. Res.* **2018**, *217*, 69–80.
97. Lamari, L.; Bouras, N.; Boudjella, H.; Ould EL Hadj-Khelil, A.; Ould El Hadj, M.D.; Sabaou, N. Influence de quelques souches bactériennes d'origine saharienne sur l'expression de la fusariose du lin et du palmier dattier. *Algerian J. Arid Environ.* **2014**, *4*, 65–77.
98. Miljaković, D.; Marinković, J.; Balešević-Tubić, S. The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1037.
99. Verma, P.P.; Shelake, R.M.; Das, S.; Sharma, P.; Kim, J.Y. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF): Potential biological control agents of diseases and pests. In *Microbial Interventions in Agriculture and Environment*; Singh, D., Gupta, V., Prabha, R., Eds.; Springer: Singapore, 2019; pp. 281–311. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8391-5_11.
100. Wang, X.Q.; Zhao, D.L.; Shen, L.L.; Jing, C.L.; Zhang, C.S. Application and mechanisms of *Bacillus subtilis* in biological control of plant disease. In *Role of Rhizospheric Microbes in Soil*; Meena, V., Ed.; Springer: Singapore, 2018; pp. 225–250. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8402-7_9.
101. Yu, Y.; Gui, Y.; Li, Z.; Jiang, C.; Guo, J.; Niu, D. Induced systemic resistance for improving plant immunity by beneficial microbes. *Plants* **2022**, *11*, 386. <https://doi.org/10.3390/plants11030386>.
102. Jiang, C.H.; Yao, X.F.; Mi, D.D.; Li, Z.J.; Yang, B.Y.; Zheng, Y.; Qi, Y.-J.; Guo, J.H. Comparative transcriptome analysis reveals the biocontrol mechanism of *Bacillus velezensis* F21 against *Fusarium* wilt on watermelon. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 652. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00652>.
103. Kumar, B.P.; Trimurtulu, N.; Gopal, A.V. Potential Screening of Indigenous Drought Stress Tolerant Bacteria for Plant Growth Promotion (PGP) Traits: An In-vitro Study. *Int. Res. J. Pure Appl. Chem.* **2020**, *22*, 8–21.
104. Cui, W.; He, P.; Munir, S.; He, P.; Li, X.; Li, Y.; Li, Y.; Wu, J.; Wu, Y.; Yang, L.; et al. Efficacy of plant growth promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* B9601-Y2 for biocontrol of southern corn leaf blight. *Biol. Control* **2019**, *139*, 104080. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104080>.
105. Kaur, R.; Kaur, S.; Kaur, N. Phosphate Solubilizing Bacteria: A Neglected Bioresource for Ameliorating Biotic Stress in Plants. In *Plant-Microbe Dynamics: Recent Advances for Sustainable Agriculture*; Pirzadah, T.B., Malik, B., Hakeem, K.R., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2021; pp. 39–50.

106. Rabhi, N.E.H.; Silini, A.; Cherif-Silini, H.; Yahiaoui, B.; Lekired, A.; Robineau, M.; Esmaeel, Q.; Jacquard, C.; Vaillant-Gaveau, N.; Clément, C.; et al. *Pseudomonas knackmussii* MLR6, a rhizospheric strain isolated from halophyte, enhances salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *125*, 1836–1851.
107. Goswami, M.; Deka, S. Isolation of a novel rhizobacteria having multiple plant growth promoting traits and antifungal activity against certain phytopathogens. *Microbiol. Res.* **2020**, *240*, 126516. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126516>.
108. Singh, M.; Singh, D.; Gupta, A.; Pandey, K.D.; Singh, P.K.; Kumar, A. Plant growth promoting rhizobacteria: Application in biofertilizers and biocontrol of phytopathogens. In *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture*; Singh, A.K., Kumar, A., Singh, P.K., Eds.; Woodhead Publishing: Sawston, UK, 2019; pp. 41–66.
109. Jadhav, H.P.; Shaikh, S.S.; Sayyed, R.Z. Role of hydrolytic enzymes of rhizoflora in biocontrol of fungal phytopathogens: An overview. In *Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation*; Mehnaz, S., Ed.; Springer: Singapore, 2017; pp. 183–203. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4862-3_9.
110. Muniroh, M.S.; Nusaibah, S.A.; Vadamalai, G.; Siddique, Y. Proficiency of biocontrol agents as plant growth promoters and hydrolytic enzyme producers in *Ganoderma boninense* infected oil palm seedlings. *Curr. Plant Biol.* **2019**, *20*, 100116.
111. Radhakrishnan, R.; Hashem, A.; Abd_Allah, E.F. *Bacillus*: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 667. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00667>.
112. Silini-Cherif, H.; Silini, A.; Ghoul, M.; Yadav, S. Isolation and characterization of plant growth promoting traits of a rhizobacteria: *Pantoea agglomerans* lma2. *Pakistan J. Biol. Sci. PJB* **2012**, *15*, 267–276.
113. Silini, A.; Cherif-Silini, H.; Yahiaoui, B. Growing varieties durum wheat (*Triticum durum*) in response to the effect of osmolytes and inoculation by *Azotobacter chroococcum* under salt stress. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2016**, *10*, 387–399.
114. Praveen Kumar, G.; Mir Hassan Ahmed, S.K.; Desai, S.; Leo Daniel Amalraj, E.; Rasul, A. *In vitro* screening for abiotic stress tolerance in potent biocontrol and plant growth promoting strains of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. *Int. J. Bacteriol.* **2014**, *2014*, 195946. <https://doi.org/10.1155/2014/195946>.
115. Chari, K.D.; Reddy, R.S.; Triveni, S.; Trimurtulu, N.; Rani, C.V.D.; Sreedhar, M. Isolation and characterization of abiotic stress tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp. from different rhizospheric soils of Telangana. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia.* **2018**, *15*, 485–494.
116. Ramakrishna, W.; Rathore, P.; Kumari, R.; Yadav, R. Brown gold of marginal soil: Plant growth promoting bacteria to overcome plant abiotic stress for agriculture, biofuels and carbon sequestration. *Sci. Total Environ.* **2020**, *711*, 135062. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135062>.
117. Nazli, F.; Mustafa, A.; Ahmad, M.; Hussain, A.; Jamil, M.; Wang, X.; Shakeel, Q.; Imtiaz, M.; El-Esawi, M.A. A review on practical application and potentials of phytohormone-producing plant growth-promoting rhizobacteria for inducing heavy metal tolerance in crops. *Sustainability* **2020**, *12*, 9056. <https://doi.org/10.3390/su12219056>.

ملخص

ثبت ان استخدام العوامل المحلية البكتيرية المرتبطة بنخيل التمر (*Phoenix dactylifera* L.) ذات القدرة في مكافحة الحويبة لمرض البيوض الناتج عن فطر (*Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*) هو الطريق الواعد. أجريت العزلة البكتيرية انطلاقاً من الجذور، الريزوسفير والتربة لبساتين النخيل الوباتية في وادي مزاب-غرداية الجزائر. أظهرت 8 عزلات بكتيرية (83، 84، 300، 333، 322، 260، 249 و 227) من أصل 335 عزلة تم اختيارها من 75 سلالة نشطة على FOA، نشاطاً قوياً في المختبر ضد عدة سلالات من هذا الممرض ومسببات الأمراض النباتية الأخرى. أثبت تعريفهم التطوري انتمائهم إلى جنس *Bacillus* (*B. subtilis*، *B. halotolerans*، *B. atrophaeus*)، *B. subtilis* و *B. subtilis*، *B. paralicheniformis*، *B. amyloliquefasiens*، *Bacillus sp* وطاقها اللاخوي مماثلة لتلك الموجودة في الزراعة الأحادية. على عكس المركبات القابلة للانتشار، لم تظهر المركبات العضوية الطيارة قدرة كبيرة مضادة للفطريات. لتقييم التأثير المضاد، في الجسم الحي، تم إصابة بذور نخيل التمر المنتشرة بـ FOA وتم معالجتها بسلالات *Bacillus*. بعد 45 يوماً من الحضان في درجة حرارة الغرفة وفي الظلام تم تقدير التأثير المثبط للفطريات، حيث أظهرت العزلات 260، 84 و 333 حماية أفضل للجذور ضد الإصابة. أظهرت هذه السلالات البكتيرية إمكانية ملموسة في تحسين نمو النبات وقدرته على تحمل عوامل الإجهاد اللاحيوي. تم تقييم آثارها المفيدة الوقائية والعلاجية والتأثيرات المصاحبة مع FOA في مرحلة الأوراق في الوسط المعقم وفي التربة غير المعقمة. أظهرت النتائج تحسناً في المعايير المورفولوجية وأصباغ الكلوروفيل ونشاط الإنزيم المضاد للاكسدة. ويلاحظ انخفاض في تركيز عوامل الإجهاد (البرولين والسكر و MDA) بعد التلقيح البكتيري. وبالتالي، يجب أن يجمع عامل مكافحة البيولوجية الفعال بين العديد من الخصائص المفيدة لاستخدامه بنجاح في الموقع. تبقى *Bacillus* المرشح الأفضل للمكافحة البيولوجية.

الكلمات المفتاحية: *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*، نخيل التمر، *Bacillus*، مكافحة الحويبة.

Résumé

L'utilisation d'agents indigènes de la microflore bactérienne associée au palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) ayant des potentialités dans le biocontrôle de la maladie du Bayoud causée par *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (FOA) est la voie la plus prometteuse. L'isolement bactérien a été réalisé à partir des racines, de la rhizosphère et du sol des palmeraies épidémiques dans la vallée du M'zab-Ghardaïa-Algérie. Un total de 8 isolats bactériens (83, 84, 300, 333, 322, 260, 249 et 227) sur 335 sélectionnés parmi 75 souches actifs sur le FOA, ont montré une forte activité *in vitro* contre plusieurs souches de ce pathogène et d'autres phytopathogènes. Leur identification phylogénétique a prouvé leur appartenance au genre *Bacillus* (*B. atrophaeus*, *B. halotolerans*, *B. subtilis*, *Bacillus sp*, *B. amyloliquefasiens*, *B. paralicheniformis*, *B. subtilis* et *B. subtilis*, respectivement). La capacité inhibitrice de ces bactéries vis-à-vis du FOA en co-culture et leur surnageant acellulaire est identique à celle en monoculture. Contrairement aux composés diffusibles, les composés organiques volatils n'ont pas montré de capacité antifongique significative. Pour évaluer l'effet antagoniste, *in vivo*, des graines germées de palmier dattier ont été infectées par le FOA et traitées par les souches de *Bacillus*. Après 45 jours d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'effet fongistatique a été estimé montrant que les isolats, 84, 260 et 333 manifestent une meilleure protection des racines contre l'infection. Ces souches bactériennes ont montré des potentialités d'amélioration de la croissance végétale et une tolérance aux facteurs du stress abiotique appréciables. Leurs impacts bénéfiques préventif, curatif et concomitant avec le FOA ont été évalués au stade feuille sur support stérile et dans un sol non stérile. Les résultats ont montré une amélioration des paramètres morphologiques, des pigments chlorophylliens et de l'activité des enzymes antioxydantes. Une réduction de la concentration des facteurs de stress (proline, sucre et MDA) est notée après inoculation bactérienne. Ainsi, un agent de lutte biologique efficace doit combiner plusieurs caractéristiques bénéfiques pour être utilisé avec succès *in situ*. *Bacillus* reste le meilleur candidat pour la lutte biologique.

Mots clés : *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, Palmier dattier, *Bacillus*, Biocontrôle.

Abstract

The use of indigenous agents of the bacterial microflora associated with date palm (*Phoenix dactylifera* L.) having potential in the biocontrol of Bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (FOA) is the most promising route. Bacterial isolation was carried out from the roots, rhizosphere and soil of epidemic palm groves in the M'zab-Ghardaïa valley-Algeria. A total of 8 bacterial isolates (83, 84, 300, 333, 322, 260, 249 and 227) out of 335 selected from 75 strains active on FOA, showed strong activity *in vitro* against several strains of this pathogen and other phytopathogens. Their phylogenetic identification proved their belonging to the *Bacillus* genus (*B. atrophaeus*, *B. halotolerans*, *B. subtilis*, *Bacillus sp*, *B. amyloliquefasiens*, *B. paralicheniformis*, *B. subtilis* and *B. subtilis*, respectively). The inhibitory capacity of these bacteria against FOA in co-culture and their acellular supernatant is identical to that in monoculture. Unlike diffusible compounds, volatile organic compounds did not show significant antifungal capacity. To evaluate the antagonistic effect, *in vivo*, germinated date palm seeds were infected with FOA and treated with *Bacillus* strains. After 45 days of incubation at room temperature and in the dark, the fungistatic effect was estimated showing that isolates 84, 260 and 333 showed better protection of the roots against infection. These bacterial strains showed potential for improving plant growth and tolerance to appreciable abiotic stress factors. Their beneficial preventive, curative and concomitant impacts with FOA were evaluated at the leaf stage on sterile support and in non-sterile soil. The results showed an improvement in morphological parameters, chlorophyll pigments and antioxidant enzyme activity. A reduction in the concentration of stress factors (proline, sugar and MDA) is noted after bacterial inoculation. Thus, an effective biological control agent must combine several beneficial characteristics to be used successfully *in situ*. *Bacillus* remains the best candidate for biological control.

Keywords: *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, Date palm, *Bacillus*, Biocontrol.