

UNIVERSITE KASDI MERBAH-OUARGLA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologiques



Mémoire en Vue de l'Obtention du Diplôme

MASTER ACADEMIQUE

Domaine :Sciences de la Nature et de la Vie

Filière :Sciences Biologies

Spécialité :Biotechnologie végétale

Présenté par : MOULAI Yassmine ET TOUNSI Zineb

Thème

**EVALUATION DU POUVOIR ANTAGONISTE DE QUELQUES
SOUCHES RHIZOBIENNES CONTRE CERTAINS
CHAMPINGONS PATHOGENES DE LA LUZERNE.**

Soutenu publiquement

Le :29/06/2021

Devant le jury :

Présidente	Mme SALHI Nesrin	UKM	Ouargla
Promoteur	Mr AZIB Salim	UKM	Ouargla
Examineur	Mr CHAABENNA	UKM	Ouargla

l'année universitaire: 2020/2021

Evaluation du pouvoir antagoniste de quelques souches rhizobiennes contre certains champignons pathogènes de la luzerne.

Résumé

Ce présent travail traite le biocontrôle de certaines maladies fongiques (*Fusarium*, *Alternaria* et *Curvilaria*) de la luzerne (*Medicago sativa* L.) par inoculation avec trois souches de *Sinorhizobium meliloti* (G535, E141 et O211) isolées de la même plante, dans l'exploitation agricole de l'université de Ouargla. L'inoculation par les rhizobia pour le contrôle biologique représente une alternative efficace dans la gestion et la résistance contre maladies phytopathogènes.

Mots clés : biocontrôle, inoculation, rhizobia, champignons pathogènes, luzerne.

Evaluation of the antagonistic power of some rhizobial strains against some pathogenic fungi of alfalfa.

Abstract

This work deals with the biocontrol of some fungal diseases (*Fusarium*, *Alternaria* and *Curvilaria*) of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by inoculation with three strains of *Sinorhizobium meliloti* (G535, E141 and O211) isolated from the same plant, in the farm of the University of Ouargla. The inoculation by rhizobia for biological control represents an effective alternative in the management and resistance against phytopathogenic diseases.

Keywords: biocontrol, inoculation, rhizobia, pathogenic fungi, alfalfa.

تقييم القوة المضادة لبعض السلالات الجذرية ضد بعض الفطريات المسببة للأمراض من البرسيم الحجازي.

المخلص:

يتناول هذا العمل مكافحة الحيوية لبعض الأمراض الفطرية (*Fusarium*، *Alternaria* و *Curvilaria*) في البرسيم (*Medicago sativa* L.) عن طريق التلقيح بثلاث سلالات *Sinorhizobium meliloti* (G535 و E141 و O211) المعزولة من نفس النبات في مزرعة جامعة ورقلة. يمثل التلقيح بواسطة الجذور للمكافحة البيولوجية بديلاً فعالاً في إدارة ومقاومة الأمراض الممرضة للنبات.

الكلمات المفتاحية: مكافحة الحيوية، التلقيح، رهيذوبيا، الفطريات المسببة للأمراض، البرسيم.

Remerciements :

Nous tenons à remercier le Dieu tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté, ainsi que tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

nous remercions également tous les enseignants du département des sciences biologiques et plus particulièrement notre promoteur : M. AZIB Salim, non seulement pour l'aide très précieuse qu'il nous a apporté, mais aussi pour son enthousiasme communicatif, sa patience et sa totale disponibilité durant l'encadrement de ce travail.

Nos remerciements vont également à AmmiTahar, responsable e la gestion de l'exploitation agricole de l'université sa précieuse contribution.

Enfin, nous remercions tous ceux et toutes celles qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce modeste travail.

Yasmine et Zineb

Dédicaces

*C'est avec toute l'ardeur de mes sentiments que je dédie ce
modeste travail, qui est le fruit de ma profonde
reconnaissance à :*

*Mes parents, mon exemple dans cette vie, que dieu les
garde et les protège. Pour leurs soutiens et pour leurs
compréhensions qui n'ont pas d'équivalent.*

*Mon frère Mohammed et mes sœurs Malika, Mounira,
Hadjer et Zakia*

A mes nièces Racha, Lina et Meriem

A mes neveux Nazim et Abde El Mounaim Akram

*Mes chères copines : Yasmine, Zahra, Zineb, Maroua et
Amina*

*Tous mes enseignants surtout « M. Azib » et tous ceux
que j'aime dans le monde.*

Moulai Yassmine.

Dédicaces

*C'est avec toute l'ardeur de mes sentiments que je dédie ce
modeste travail, qui est le fruit de ma profonde
reconnaissance à :*

*Mes parents, mon exemple dans cette vie, que dieu les
garde et les protège. Pour leurs soutiens et pour leurs
compréhensions qui n'ont pas d'équivalent.*

A mon fiancé Saadi

*Mes frères Housseem et Oussama et mes sœurs
Khaoula, Zahra et Rahaf*

*A mes copines Hana, Assala, Yasmine et Maroua. Tous
mes enseignants surtout « M. Azib » et tous ceux que
j'aime dans le monde.*

Tounsi Zineb

Liste des Figures

Figure 1:	cycle de l'azote	3.
Figure 2:	Jaunissement de la nervure centrale des feuilles de la luzerne par la verticilliose	10.
Figure 3:	Les symptômes de mildiou sur les feuilles de la luzerne (à gauche) tâche.	10.
Figure 4:	Tache commune des feuilles	11.
Figure 5:	Pieds attaqués par rhizoctone violet	12.
Figure 6:	L'antracnose forme des lésions à la base des tiges	13.
Figure 7:	Des taches sur les feuilles de luzerne causées par le <i>Stemphylium</i>	14.
Figure 8:	Brûlure des feuilles par <i>Curvularia</i> .	15.
Figure 9:	Evolution des symptômes de lésion foliaire causée par	16.
Figure 10:	Symptômes de la pourriture fusarienne des racines.	17.
Figure 11:	Développement des symptômes de la maladie chez <i>Medicago truncatula</i>	32.
Figure 12:	colonisation par AM (a), nombre de nodules racinaires (b), incidence de la maladie (c) et indice de maladie (d) de la luzerne (<i>Medicago sativa</i> L.)	38.

Liste des photos

Photo 1:	Serre experimentale de l'université de Ouargla.	18.
Photo 2:	préparation de l'inoculum bactérien	19.
Photo 3:	agitation des extraits aqueux.	20.
Photo 4:	mesure de PH.	20.
Photo 5:	désinfection et pérégrination des.	21.
Photo 6:	préparation des jarres de léonard	21.
Photo 7:	préparation des pots.	22..
Photo 8:	l'inoculation fongique.	22.
Photo 9:	préparation de l'inoculum bactérien	23.
Photo 10:	préparation du milieu de culture.	24.
Photo 11:	milieu YEM préparé	25
Photo 12:	suivie de l'expérimentation.	25.
Photo 13	Mortalités des plantules de luzerne dans les jarres de Léonard	26.

Liste des tableaux

Tableau 1:	Provenance des souches fongiques utilisées.	18.
Tableau 2:	Provenance des souches rhizobiennes utilisées	19.
Tableau 3:	Composition de la solution nutritive de Fahareus	23.
Tableau 4:	les composants de milieux YEM.	24.

SOMMAIRE

Remerciements

Resumé

Liste des abreviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des photos

INTRODUCTION 1.

Chapitre i:etude bibleographique

I.1 L'azote dans la nature 3.

I.2 La fixation biologique de l'azote 3.

I.2.1 Les fixateurs libres 4.

I.2.2 Les fixateurs symbiotiques 4.

I.3 Partenaires de la symbiose fixatrice d'azote 5.

I.3.1 Les microsymbiontes (rhizobia) 5.

I.3.1.1 Description des bactéries 5.

I.3.1.2 Taxonomie 5.

I.3.2 Les *Fabaceae* (macrosymbiote) 5.

I.3.2.1 Description 5.

I.3.2.2 Importance 6.

I.3.2.2.1 Importance agronomique	6.
I.3.2.2.2 Importance écologique	6.
I.3.2.2.3 Importance alimentaire	7.
I.4 Description de la luzerne (<i>Medicago sativa</i> L.)	7.
I.4.1 Position systématique de la Luzerne	8.
I.5 Les maladies cryptogamiques de la luzerne	9.
I.5.1 La verticilliose	9.
I.5.2 Le mildiou (<i>Peronospora trifoliorum</i>)	10.
I.5.3 Pepper-spot (<i>Pseudopeziza medicaginis</i>)	11.
I.5.4 Le rhizoctone Violet (<i>Rhizoctonia violacea</i>)	11.
I.5.5 L'anthracnose	12.
I.5.6 La stemphyliose	13.
I.5.7 La curvulariose	14.
I.5.8 L'alternariose	15.
I.5.8 La Fusariose	16.
CHAPITE II matériel et méthodes	
II.1 Site expérimentale	18.
II.2 Matériel biologique	18.
II.2.1 Les souches fongiques	18.
II.2.2 Les souches rhizobiennes	18.

II.2.3 Matériel végétal	19.
II.2 Méthodes	20.
II.2.1 Préparation du sable de culture	20.
II.2.2 Désinfection et pérgermination des graines	20.
II.2.3 Préparation des jarres de Léonard	21.
II.2.4 Préparation des pots	22.
II.2.5 Préparation de l'inoculum fongique	22.
II.2.6 Préparation de l'inoculum bactérien	23.
II.2.6.1 Milieu de culture et solution nutritive utilisés	23.
II.3 Suivre d'expérimentation	25.

CHAPITRE III :RESULTAS ET DISCUSSION

III.1 Cas général	28.
III.2 Etude de cas 1	30.
III.2.2 Objectif	30.
III.2.3 Matériel et méthodes	30.
III.2.3.1 Souches de <i>Sinorhizobium meliloti</i> et conditions de croissance	30.
III.2.3.2 Souches fongiques et conditions de croissance	30.
III.2.3.3 Matériel végétal et conditions de croissance	30.
III.2.3.4 Tests de pathogénicité et de bioprotection	31.
III.2.3.4.1 Symptômes enregistrés	31.
III.2.4 Résultats	31.

III.2.4.1 Croissance de <i>Phoma medicaginis</i>	31.
III.2.4.1.1 Effets des isolats de <i>Sinorizobium</i> sur la croissance de <i>Medicago truncatula</i>	31.
III.2.4.1.2 Inhibition par <i>Sinorhizobium</i> du développement de la maladie de <i>P. medicaginis</i> sur <i>Medicago truncatula</i>	32.
III.2.5 Discussion	34.
III.3 Etude de cas 2	35.
III.3.1 Objectif	35.
III.3.2 Matériel et méthodes	36.
III.3.2.1 Matériaux végétaux et fongiques	36.
III.3.2.2 Milieu de croissance des plantes	37.
III.3.2.3 Étude en serre	37.
III.3.3 Résultats	38.
III.3.4 Discussion	39.
III.4 Etude de cas 3	41.
III.4.1 Objectif	41.
III.4.2 Matériel et méthodes	41.
III.4.2.1 Matériel biologique	41.
III.4.2.2 Croissance des plantes et récolte	42.
III.4.3 Résultats	42.
III.4.3.1 Apparition de la maladie et nodulation	42.
III.4.3.2 Croissance des plantes	42.

III.4.3.3 Concentrations de N et de P dans les plantes	43.
III.4.4 Discussion	43.
Conclusion	45.
Références bibliographiques	

Introduction

L'azote moléculaire en phase gazeuse (N_2) est le plus grand réservoir d'azote et représente environ 78% de l'atmosphère terrestre. Il est incorporé à la biosphère via le processus de fixation de N_2 (Zerkle et Mikhail, 2017).

L'azote est nécessaire à tous les organismes vivants pour produire des protéines, des acides nucléiques et de nombreuses autres biomolécules. C'est un élément essentiel du développement des plantes et un facteur limitant de leurs croissances. Il représente environ 2% de la matière sèche totale des plantes entrant dans la chaîne alimentaire. Néanmoins, les plantes ne peuvent pas accéder directement au gaz de diazote, sous sa forme moléculaire en raison de sa forte liaison triple. Les plantes absorbent l'azote disponible dans le sol à travers leurs racines sous forme d'ammonium et de nitrates (Santi et *al.*, 2013; LI et *al.*, 2015).

Il existe des relations étroites entre l'application excessive d'engrais azotés et les problèmes environnementaux tels que l'eutrophisation, l'effet de serre et les pluies acides, la consommation d'eau souterraine contaminée ou de cultures à forte teneur en nitrates a des effets négatifs sur la santé humaine (Liu et *al.*, 2014).

La luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.) est la plus importante culture de légumineuses fourragères dans les zones arides et semi-arides de l'Afrique du Nord (Elboutahiri et *al.*, 2010). Dans le Sahara algérien, sa culture est de loin la principale espèce fourragère cultivée (Chaabena et *al.*, 2012). Cette espèce est une légumineuse fourragère vivace qui a une excellente valeur nutritive, une digestibilité élevée et un rendement de biomasse élevé et contribue à l'incorporation de grandes quantités d'azote (jusqu'à 250 kg / ha/ an), avec un avantage économique conséquent, aidant à réduire l'application d'engrais synthétiques (Campillo et *al.*, 2003 ; Carlson et Huss-Danell, 2003 ; Jensen et Hauggaard Nielsen, 2003).

L'infection des plantes par un champignon phytopathogène est un processus appelé "cycle de la maladie ", dont la complexité varie selon les espèces, mais cela comprend toujours un certain nombre d'étapes obligatoires (inoculation, adhésion, germination, pénétration et invasion ; Javier et al., 2014), où les champignons utilisent des nutriments de leurs hôtes, et produisent plus de spores pendant leur croissance, ce qui contribue à la propagation de l'agent pathogène. Les symptômes courants causés par ce dernier

comprennent les taches, les flétrissements, les brûlures, et les chancres touchant les feuilles; alors que les pourritures et les dépérissements touchent les fruits.

De nouvelles approches de contrôle sont appliquées ces dernières années comme stratégies de lutte biologique. Elles sont sans inconvénients pour les cultures et les humains avec une protection de l'environnement, passant par une gestion optimale des champignons phytopathogènes et des mauvaises herbes arrivant à des sols fertiles exempt de bioagresseurs (Unep, 2000). C'est pourquoi, des recherche sérieuses ont été menées pour identifier ces méthodes de protection des végétaux (Prapagdee et *al.*, 2008). Pour cela, une idée intéressante pour lutter contre les agents pathogènes consiste en l'utilisation d'agents microbiens antagonistes, comme biopesticides, cela offre un potentiel très prometteur et viable par la diversité des agents microbiens (Laird et *al.*, 1990). De plus, ces antagonistes sont souvent efficaces en faibles quantités et leurs activités protectrices peuvent relever de mécanismes multiples et déclenchent donc rarement des phénomènes de résistance chez le pathogène à cause d'une faible pression de sélection (Fravel, 2005 ; Lee et *al.*, 2006).

Les rhizobia sont considérés comme des antagonistes très efficaces des champignons phytopathogènes. Ils ont été signalé comme des inhibiteurs significatifs de la croissance des champignons pathogènes tels que: *Pythium*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* et *Phytophthora* (Bardin et *al.*, 2004 ; Kumar et *al.*, 2006 ; Hemissi et *al.*, 2011 ; Ozgonen et Gulcu, 2011) d'où l'intérêt d'étudier l'action des souches de rhizobia sur la croissance et l'inhibition de certains champignons phytopathogènes.

L'objectif assigné à ce travail de recherche est l'étude du biocontrôle, dans des conditions semicontrôlées, de certaines maladies fongiques (*Fusarium*, *Alternaria* et *Curvilaria*) de la luzerne (*Medicago sativa* L.) par inoculation avec trois souches de *Sinorhizobium meliloti* (G535, E141 et O211) isolées de la même plante.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 L'azote dans la nature

L'azote est l'un des éléments majeurs de la vie. C'est le quatrième constituant des plantes qui est utilisé dans l'élaboration de molécules importantes comme les protéines, les acides nucléiques et la chlorophylle. C'est le constituant principal de l'atmosphère terrestre est présent dans la nature sous deux états ; à l'état libre, sous forme de N_2 ou il constitue 78% de l'air que nous respirons et à l'état combiné, sous forme minérale comme l'ammoniaque, nitrite, nitrate, ou sous forme organique (Hopkins, 2003).

Les plantes absorbent l'azote dans le sol sous forme de nitrates (NO_3^-) et d'ammonium (NH_4^+). L'importance relative de chacune de ces formes dépend de l'espèce végétale et des conditions du milieu.

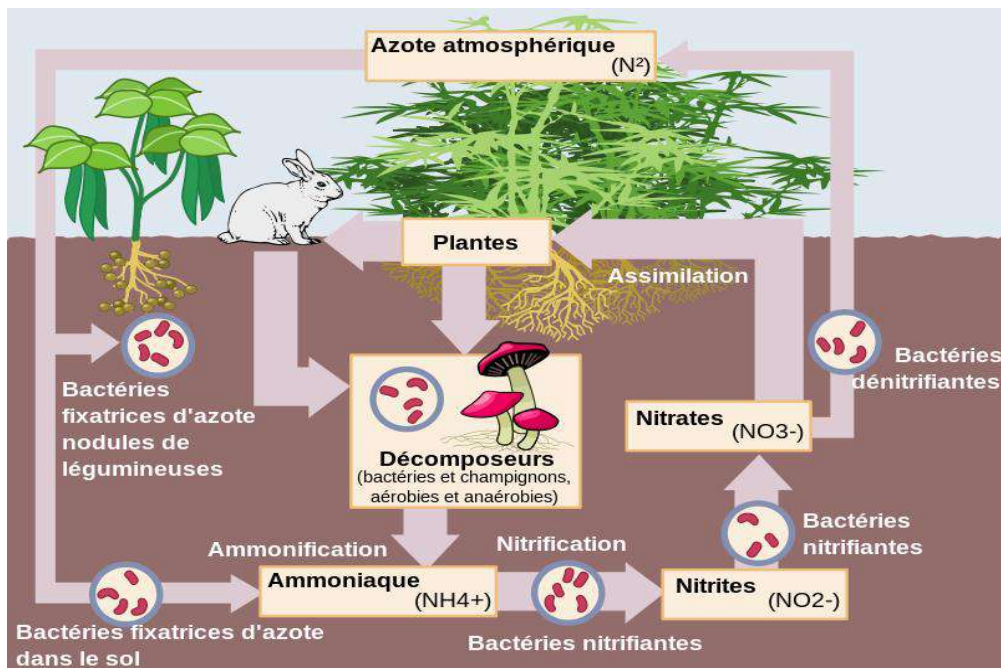


Figure 1: cycle de l'azote.

I.2 La fixation biologique de l'azote

On appelle fixation de l'azote le processus de transformation d'azote atmosphérique en ammoniac (Tortora, 2003). La fixation biologique de l'azote est le processus biochimique le plus important après l'assimilation du CO_2 . Elle est très importante pour fournir l'azote disponible pour les plantes dans les systèmes naturels et dans les régions agricoles où l'engrais synthétique est trop cher ou non disponible (Vincent, 1970).

L'agriculture des anciens grecs et romains a exploité la fixation biologique de l'azote en cultivant des légumineuses, bien que le rôle des microorganismes dans la fixation de l'azote n'ait été découvert qu'en 1888 par H. Hellriegel et H. Wilfarth (Hopkins, 2003).

Les organismes qui peuvent fixer l'azote, c'est-à-dire convertissent l'azote gazeux stable dans l'atmosphère en une forme biologiquement utile, appartiennent à un groupe biologique connu sous le nom de procaryotes. Ces procaryotes fixateurs d'azote, remplissent une fonction écologique irremplaçable, puisque jusqu'à la découverte des procédés de synthèse industrielle de l'ammoniac, ils étaient les seuls capables à faire entrer l'azote dans les cycles biologiques (Davet, 1996).

La fixation de l'azote est l'apanage du domaine des procaryotes simplement parce qu'ils possèdent un complexe enzymatique nommé di-nitrogénase qui catalyse la réduction de l'azote en ammoniac. Les microorganismes fixateurs se trouvent soit à l'état libre dans le sol (Ou dans l'eau), soit associés de façon étroite à d'autres organismes (champignons (lichen) ou végétaux chlorophylliens) (Hopkins, 2003).

I.2.1 Les fixateurs libres

Ils vivent librement dans le sol, dans une zone à l'interface entre le sol et les racines des plantes, appelée rhizosphère. La majorité des bactéries libres fixatrices d'azote sont capables de fixer de grandes quantités. On trouve des bactéries de ce type surtout dans les prairies ; elles sont en forte concentration dans la rhizosphère (Tortora et al., 2003). A ce groupe appartiennent des bactéries aérobies et anaérobies. Il s'agit principalement : des bactéries aérobies (*Azotobacter*) et des bactéries anaérobies (*Citrobacter*).

I.2.2 Les fixateurs symbiotiques

Les espèces fixatrices d'azote symbiotique sont nettement moins nombreuses que les fixatrices libres. On y rencontre essentiellement des rhizobia, des actinomycètes (*Frankia*) et des cyanobactéries (*Anabaena azollae*) (Pelmont, 1995).

Les bactéries de ce type jouent un rôle prépondérant dans la croissance des plantes agricoles (Tortora ET AL., 2003). La symbiose la plus importante d'un point de vue écologique et agronomique est celle associant les rhizobia aux légumineuses (Denarie, 2000).

La forme la plus commune d'association symbiotique provoque la formation sur la racine (ou parfois sur la tige) de la plante hôte, de structures multicellulaires hypertrophiées, nommées nodules (Hopkins, 2003). Les plantes concernées en profitent, en utilisant les produits de la fixation bactérienne de l'azote. En contrepartie, la plante hôte fournit aux bactéroïdes des composés carbonés, de l'énergie, ainsi que les mécanismes de protection nécessaires (Richter, 1993).

I.3 Partenaires de la symbiose fixatrice d'azote

I.3.1 Les microsymbiontes (rhizobia)

I.3.1.1 Description des bactéries

Les rhizobia sont des bactéries Gram négatives, en forme de bâtonnets réguliers de 0.5 à 0.9 µm de largeur et de 1.2 à 3 µm de longueur (Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben, 1994). Pour les rhizobia à croissance rapide, les cellules sont mobiles par 2 à 6 flagelles péritriches et ceux à croissance lente sont mobiles par un seul flagelle polaire ou subpolaire (Somasegaran et Hoben, 1994).

I.3.1.2 Taxonomie

Des recherches approfondies ont été menées sur la diversité des rhizobia au cours des 25 dernières années, de sorte que de nombreuses nouvelles espèces et genres ont été officiellement décrites (de Lajudie et *al.*, 2019). Au début des années 80 du siècle passé, toutes les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote étaient classées dans le genre *Rhizobium*, avec six espèces nommées: *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. lupin* et *R. japonicum* (Somasegaran et Hoben, 1985). Récemment, environ 238 espèces réparties dans 18 genres ont été décrites (Shamseldin et *al.*, 2016).

I.3.2 Les *Fabaceae* (macrosymbiote)

I.3.2.1 Description

Avec près de 770 genres et plus de 19500 espèces, les légumineuses sont, après les orchidées et les astéracées, la troisième plus grande famille d'angiospermes en terme de richesse spécifique (Lewis et *al.*, 2005; Lpwg, 2013). Actuellement, la famille est divisée en

six sous-familles qui sont : *Duparquetioideae*, *Cercidoideae*, *Detarioideae*, *Dialioideae*, *Caesalpinioideae* et *Papilionoideae* (Lpwg, 2017).

On y trouve des arbres, la plupart exotiques, voire des lianes, mais surtout de nombreuses espèces herbacées vivaces ou annuelles (Guignard *et al.*, 2004), souvent volubiles et grimpantes, soit par enroulement (*Phaseolus*, *Physostigma*), soit grâce à des vrilles foliaires (*Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia*).

I.3.2.2 Importance

Les *Fabaceae* sont utilisées dans plusieurs domaines. Beaucoup d'espèces ont des importances écologique, agronomique et alimentaire.

I.3.2.2.1 Importance agronomique

Grâce à la fixation de l'azote de l'air par les rhizobiums, les *Fabaceae* peuvent redistribuer de l'azote organique au sol une fois coupées.

Cette matière organique servira de réservoir d'azote à partir duquel se formeront du NH_4^+ et du NO_3^- par l'intermédiaire de microorganismes du sol. La symbiose légumineuse-rhizobium présente donc un grand intérêt en permettant l'économie d'engrais azotés. Ainsi, la rotation d'une culture de *Poaceae* et de *Fabaceae* permet un épuisement du sol moindre qu'une culture de *Poaceae* seule (Gilleret Wilson, 1991)

I.3.2.2.2 Importance écologique

Les légumineuses alimentaires tiennent une part très importante des travaux accomplis dans des domaines aussi divers que l'agronomie, la génétique, l'entomologie, la phytopathologie et la physiologie (Baudoin *et al.*, 2001).

Les principaux objectifs de recherche, sur les légumineuses à graines, cherchent à la fois à sécuriser la nodulation, à assurer la complémentarité entre les voies d'assimilation et de fixation de l'azote, et à assurer une meilleure remobilisation de l'azote des feuilles et des tiges vers les graines. Le point fort des légumineuses est leur coût énergétique faible et leur faible contribution aux gaz à effets de serre, directement liés à l'absence de fertilisation azotée.

La réduction de la fertilisation azotée et l'amélioration des coûts et bilans énergétiques sont aujourd'hui un objectif commun à plusieurs filières dans la perspective, non seulement d'améliorer une compétitivité économique, ou de réduire des impacts environnementaux, mais surtout de développer des biocarburants (Pinochet et *al.*, 2006).

I.3.2.2.3 Importance alimentaire

De nombreuses espèces cultivées appartiennent à la famille des Fabaceae. Elles constituent une source très importante de protéines et de lipides dans l'alimentation humaine et animale (Journet et *al.*, 2001).

Elles constituent aussi un apport de protéines peu coûteux mais néanmoins important (18 à 30% de la graine sèche) (baudoin et *al.*, 2001).

I.4 Description de la luzerne (*Medicago sativa* L.)

La luzerne cultivée est originaire d'Asie mineure, de Transcaucasie, du Turkménistan et d'Iran. L'espèce pousse dans tout le bassin méditerranéen, en Afrique du Nord, au Moyen-Orient, dans la plus grande partie de l'Europe, en Sibérie et dans le nord de l'Inde et en Chine (Quiros et Bauchan, 1988 ; Michaud et *al.*, 1988).

Elle est l'une des légumineuses fourragères les plus populaires dans le monde en raison de son rendement élevé et de sa valeur nutritionnelle (Martin 2014; Biazzi et *al.* 2017). C'est une plante vivace qui peut régénérer rapidement de nombreuses nouvelles tiges après la récolte et peut être récoltée plusieurs fois au cours de la saison de croissance (Lamm et *al.*, 2012; Brink et *al.*, 2015). En tant que légumineuse, elle peut améliorer la structure du sol grâce à son système racinaire profond et améliorer l'apport en azote des cultures subséquentes grâce à sa capacité de fixation biologique de l'azote (Huyghe et *al.* 2014). La luzerne est une légumineuse fourragère de haute qualité, en particulier pour le bétail laitier, et elle peut augmenter le rendement en matière sèche lorsqu'elle est en culture mixte (Bélangier et *al.* 2014).

À maturité, la plante possède une longue racine pivotante. En sol profond, humide et bien drainé, cette racine peut atteindre six mètres de longueur, ou même davantage, et produire au niveau du collet des racines latérales parfois nombreuses. Le collet conserve son

activité méristématique d'une année à l'autre et produit des bourgeons qui donnent naissance à de nouvelles tiges. Les feuilles sont alternes et comportent au moins trois folioles. Des rameaux secondaires et tertiaires peuvent se former à l'aisselle des feuilles. Dans les conditions normales de production fourragère, chaque pied compte 5 à 15 tiges et peut atteindre près d'un mètre de hauteur. Les fleurs sont de couleur variable mais sont le plus souvent violettes, panachées, jaunes, crème ou blanches. Après la pollinisation, elles donnent généralement une gousse spiralée. Elle est largement cultivée, particulièrement dans les régions limitées en eau, en raison de sa capacité d'absorber l'eau des couches profondes du sol (Zhu et *al.*, 2016; Sim et *al.*, 2017) et favorise la prévention de l'érosion des sols dans les zones arides et semi-arides (Quan et *al.*, 2015), ce qui lui confère un niveau relativement élevé de tolérance à la sécheresse par rapport aux autres cultures (Kang et *al.*, 2011; Tang et *al.*, 2014).

En Afrique, la luzerne est cultivée dans quelques pays situés dans les régions du nord et du sud. Le Maroc cultive près de 106 000 ha, avec un rendement moyen de 5,93 t de matière sèche par hectare. En Algérie, la luzerne occupe environ 10 000 ha, avec une production moyenne de 3 à 4 t de MS/ha. En Tunisie, la luzerne est le principal fourrage et s'étend sur environ 13 000 ha (Basigalup et *al.* 2014). Au Sahara algérien, caractérisé par un climat désertique, la luzerne est de loin la principale espèce fourragère cultivée (Chaabena et *al.*, 2012).

I.4.1 Position systématique de la Luzerne

Selon SMALL ET JOMPHE (1989), in HALMI (2010), la classification botanique de la luzerne est la suivante :

Règne: Plantae

Sous-règne: Tracheonbionta

Division: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Sous- classe: Rosidae

Ordre: Fabales

Famille: Fabaceae

Sous-famille: Faboideae

Tribus: Trifolieae

Genre: Medicago (L.).

I.5 Les maladies cryptogamiques de la luzerne

Les maladies de la luzerne peuvent entraîner des pertes importantes sur le rendement et la qualité à la fois. Les maladies des semis peuvent obstruer la création de support. Les maladies du flétrissement réduisent le peuplement densité et rendements. Les maladies des feuilles et des tiges provoquent une perte prématurée de feuilles et donc réduire la valeur nutritive du fourrage. Les pourritures des racines et du collet affaiblissent les plantes et sont un facteur limitant de la persistance des peuplements (Bowden, 1998).

I.5.1 La verticilliose

La verticilliose de la luzerne est une maladie causé par le champignon *verticillium alboatrum*, une maladie grave comprennent le jaunissement des extrémités des feuilles, parfois en forme de V. Il est important de remarquer que la tige demeure verticale et verte (Frate et Davis, 2008). Les symptômes comprennent le jaunissement et la défoliation de quelques branches jusqu'à un flétrissement massif de la plante entière, les bords des feuilles ont tendance à rouler vers l'intérieur. Une décoloration du tissu vasculaire peut être observée lorsqu'une plante infectée est coupée longitudinalement (De Savigny, 2005).



Figure

2: Jaunissement de la nervure centrale des feuilles de la luzerne par la verticilliose (Simonneau et *al.*, 2011).

I.5.2 Le mildiou (*Peronospora trifoliorum*)

Le mildiou est fréquent sur les jeunes cultures et les repousses de la luzerne dans les zones tempérées à climat humide vers la fin du printemps et en automne car le champignon a besoin d'humidité pour former des spores (Yang, 2009).

La maladie présente des symptômes de feutrage gris violacé sur la face inférieure de la feuille et à l'extrémité de la tige, et la surface supérieure des feuilles devient vert claire (Frate et Davis, 2008).

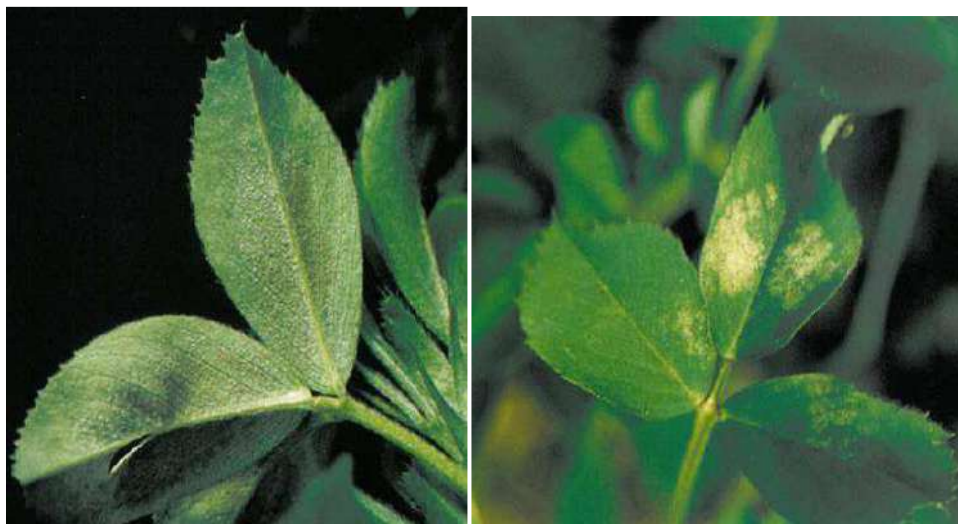


Figure 3 : Les symptômes de mildiou sur les feuilles de la luzerne (à gauche) tâche chlorotique sur la face supérieure ; (à droite) fructification grises sur la face inférieure (Simonneau et *al.*, 2011).

I.5.3 Pepper-spot (*Pseudopeziza medicaginis*)

C'est une maladie cryptogamique de luzerne qui est surtout visible en hiver et au début de printemps (Frate et Davis, 2008). Les symptômes apparaissent sur les feuilles. La maladie provoque des petites ponctuations noires ou brunes (Pepper-spot ou tache de poivre), de 0.3 cm de diamètre, entourées d'un halo clair. Lorsque ces taches sont nombreuses, elles confluent et la feuille se dessèche partiellement ou totalement. À la fin du printemps et en automne, à la suite de périodes humides et fraîches, le champignon produit des fructifications circulaires, brunes appelées « apothécies » à l'intérieur des taches (Frate et Davis, 2008).



Figure 4: Tache commune des feuilles (*Pseudopeziza medicaginis*).

I.5.4 Le rhizoctone Violet (*Rhizoctonia violacea*)

Champignon signalé dans de nombreux pays sur différentes plantes, et notamment diverses espèces légumières, ceci plus ou moins gravement, pérenniser sur différents substrats et hôtes alternatifs, cultivés ou non : luzerne, safran et de nombreuses mauvaises herbes (*Agropyron repens*, *Rumex acetosella*) (Blancard, 2015). Dans le champ, la maladie se répartit par taches. Les plantes malades jaunissent, flétrissent ou dessèchent. Le collet et le pivot racinaire sont cernés par un manchon de pourriture plus ou moins sèche, violacée, parcourue par des filaments violets et évoluant vers une pourriture plus molle (Simonneau et *al.*, 2011).



Figure 5: Pieds atteints par rhizoctone violet (Simonneau et *al.*, 2011).

I.5.5 L'antracnose

C'est une maladie causée par le champignon *Colletotrichum trifolii* dans les peuplements de luzerne plus âgés. L'antracnose provoque dans les parcelles des pieds malades. A la base des tiges des plantes atteintes se forment des lésions beiges, d'un ou plusieurs centimètres, de forme losangique ou fusiforme, bordées de brun. Au centre de ces lésions, la teinte est gris clair et ponctuée de brun foncé. La tige reste verte alors que les feuilles se flétrissent et deviennent jaunes. Puis la tige se dessèche en se courbant en crosse au sommet (Frate et Davis, 2008 ; Simonneau et *al.*, 2011).

Le champignon se conserve sous forme de mycélium dans les débris végétaux morts et dans les tissus malades des collets de la luzerne en place. Il émet ensuite des spores par forte humidité et des températures voisines de 20°C (Simonneau et *al.*, 2011).



Figure 6: L'antracnose forme des lésions à la base des tiges (Simonneau et *al.*, 2011).

I.5.6 La stemphyliose

Les tâches des feuilles et de tige de *Stemphylium* sont causées par le champignon *Stemphylium botryosum*. Cette maladie est également appelée «Target spot». Cet agent est plus fréquent dans les peuplements luxuriants après un temps chaud et humide et lorsque la récolte est retardée. Le symptôme le plus notable est la formation de lésions brunes ovales à allongées avec des centres plus clairs, s'agrandissant pour former des zones concentriques claires et brun foncé (Isleib, 2011; Telenko et Johnson, 2019). Une seule grande lésion peut faire jaunir et tomber la feuille. Les lésions plus anciennes peuvent être recouvertes d'un moule semblable à de la suie. La maladie hiverne sur de vieilles tiges infectées ou sur des graines (Isleib, 2011).



Figure 7: Des taches sur les feuilles de luzerne causées par le *Stemphylium* (Telenko et Johnson, 2019).

I.5.7 La curvulariose

Le champignon hyphomycète *Curvularia geniculata* est un pathogène foliaire facultatif pour de nombreuses espèces végétales: notamment le pâturin des prés (*Poa pratensis*) (Rogerson, 1956), les herbes en Floride (Bailey et Muchovej, 2001), l'herbe des Bermudes au Mississippi (Pratt, 2005), le riz en Chine (Jin, 1989) et les céréales en Ouzbékistan (Khasanov et al., 1990). Les agents pathogènes foliaires fongiques de la luzerne, y compris *C. geniculata*, causent des dommages en réduisant les performances générales de la plante en tant que fourrage en affectant des facteurs tels que le cycle de vie et la densité de population de la plante et donc la qualité du fourrage (Elgin et al., 1988). Les lésions apparaissent d'abord comme des parties décolorées jaunes puis brunes et deviennent des lésions caractéristiques en forme de V divisées par la nervure foliaire. Lorsque le pétiole est infecté, la feuille se flétrit et est rapidement morte. Lorsqu'elle survient sévèrement, la plante entière ressemble à une brûlure et le rendement diminue beaucoup. Les dégâts sont plus importants sur feuilles jeunes que sur les vieilles (Nilgs, 2001).



Figure 8: Brûlure des feuilles par *Curvularia* (Nilgs, 2001).

I.5.8 L'alternariose

Alternaria est un champignon phytopathogène commun trouvé dans le monde entier. Il provoque des symptômes distincts sur les feuilles de différents hôtes. De nouveaux rapports sur les pathogènes d'*Alternaria* causant des taches foliaires et des symptômes de brûlure sur la luzerne ont également été signalés au Brésil (Ávila et al., 2015), en Chine (Wang et Wang, 2010), en Canada (Abbasi et al., 2018) et en Inde (Maiti et al., 2007). Les rapports du Brésil, de Chine et du Canada ont trouvé *A. alternata* comme l'agent causal, alors que le premier rapport de l'Inde décrivait l'agent pathogène comme étant *A. longipes* sur la base des observations culturelles et morphologiques uniquement, mais aucune confirmation n'a été faite par des méthodes moléculaires (Abbasi et al., 2018).

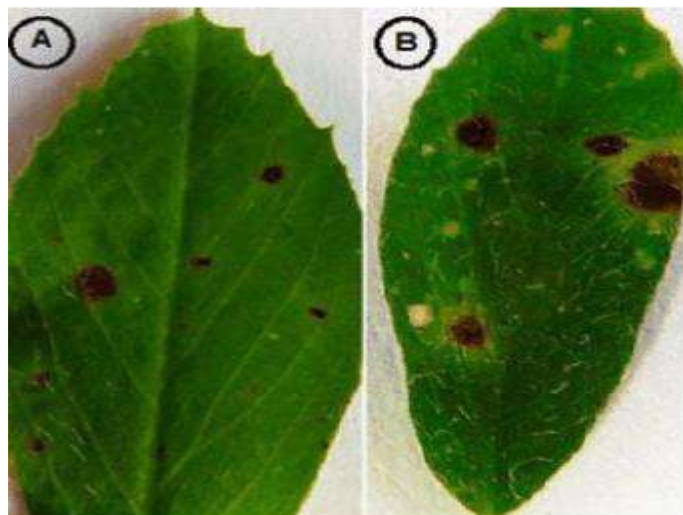


Figure 9: Evolution des symptômes de lésion foliaire causée par l'*Alternaria* sur les feuilles de la luzerne. (A) 7 jours après l'inoculation; (B) 14 jours après l'inoculation (Miguel et *al.*, 2015).

I.5.9 La Fusariose

Divers agents pathogènes fongiques transmis par le sol peuvent attaquer les plants de luzerne, entraînant des réductions de l'établissement du peuplement, du rendement, de la qualité du fourrage et de la longévité. Les maladies de la pourriture causées par les espèces de *Fusarium* sont un problème courant dans de nombreuses régions productrices de luzerne dans le monde, notamment aux États-Unis, au Canada, en Australie et en Russie (Uddin et Knous, 1991; Samac et *al.*, 2013). En Chine, la pourriture des racines induite par *Fusarium* (*Fusarium* Root Rot) de la luzerne a été identifiée pour la première fois en 1991 (Wang et *al.*, 1996; Wang et *al.*, 2005; Cao et *al.*, 2008; Li et *al.*, 2009). La présence de FRR a progressivement augmenté dans les régions de production de luzerne et entraînée des pertes économiques considérables (Yi et *al.*, 2017).

La FRR de luzerne est caractérisée par la présence de lésions nécrotiques en forme de coin brun foncé à noires dans le cortex des racines des branches et de la racine pivotante (Salter et *al.*, 1994).

Les symptômes de la maladie au-dessus du sol comprennent la chlorose des feuilles et la canopée inférieure (Couture et *al.*, 2002; Zaccardelli et *al.*, 2006). Les plants de luzerne touchés présentent également une décoloration brunâtre et des symptômes de trempage dans l'eau (water-soaking symptoms), ainsi que la pourriture des graines (Al-Askar et *al.*, 2013). Le

développement du FRR s'accompagne souvent de pourriture du collet (Samac et *al.*, 2013) et les champignons ont tendance à endommager les plantes qui sont déjà affaiblies ou endommagées par d'autres facteurs de stress (Wang et *al.*, 2010; Al-Askar et *al.*, 2012). Généralement, les peuplements de luzerne sont capables de survivre pendant 10 ans ou plus (Liu et *al.*, 2015). Une fois touchés par *Fusarium sp.*, la majorité des champs de luzerne ont montré des baisses de rendement même au cours de la deuxième année (Wallenhammar et *al.*, 2008). L'utilisation de variétés résistantes est la méthode la plus économique et la plus écologique pour lutter contre la pourriture des racines (Cong et *al.*, 2017).

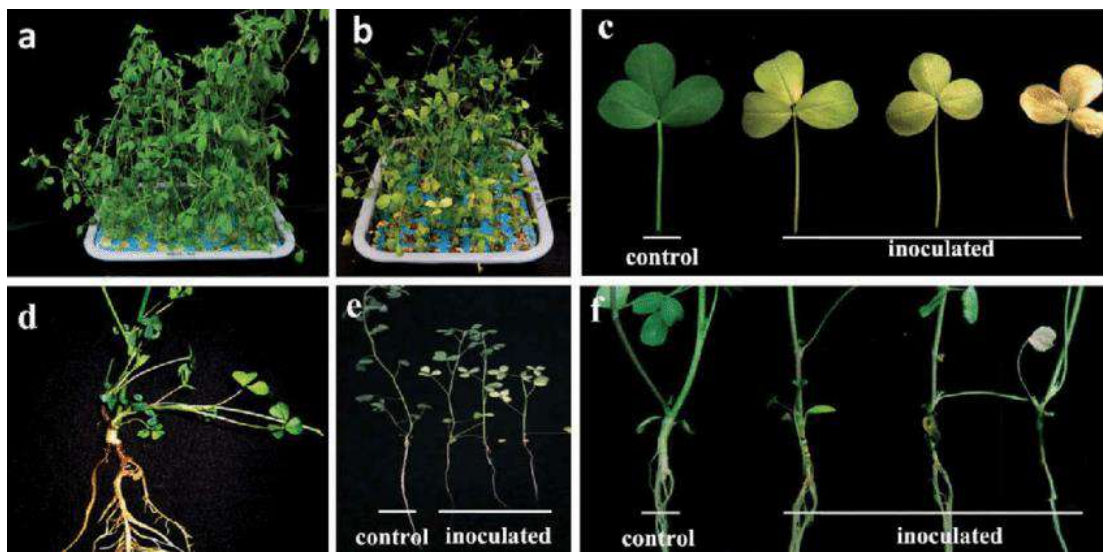


Figure 10: Symptômes de la pourriture fusarienne des racines observés après l'inoculation sur la luzerne. (a) Groupe témoin; (b) Deux semaines après l'inoculation; (c) Les troisièmes feuilles présentant une gravité variable de l'infection; (d) Symptômes de la pourriture fusarienne des racines 2 semaines après l'inoculation; (e) Plantes de luzerne présentant une gravité d'infection variable après l'inoculation; (f) Racines 2 semaines après l'inoculation (Cong et *al.*, 2017).

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

II. Matériel et méthodes

II.1 Site expérimentale

Notre expérimentation a été menée au niveau de la station expérimentale de l'université KASDI Merbah, dans une serre semi-automatisée durant la période allant des mois de février à avril de l'année 2021(Photo1).



Photo1 : Serre expérimentale de l'université de Ouargla.

II.2 Matériel biologique

II.2.1 Les souches fongiques

Trois espèces de champignons phytopathogènes de la luzerne, préalablement isolées et identifiées comme appartenant aux genres : *Fusarium*, *Alternaria* et *Curvilaria*, sont sélectionnées et utilisées dans cette étude (Habhouh et Salhi, 2020).

Tableau 1: Provenance des souches fongiques utilisées.

Souches	Code des souches	Provenance	Plante hôte
<i>Fusarium</i>	S1	Région de Ouargla	Luzerne
<i>Alternaria</i>	S2	Région de Ouargla	Luzerne
<i>Curvilaria</i>	S3	Région de Ouargla	Luzerne

II.2.2 Les souches rhizobiennes

Un total de 3 souches a été utilisé dans cette étude. Elles ont été isolées à partir des nodules racinaires de luzerne (*Medicago sativa* L.) cultivée à Ouargla, Ghardaïa et El Oued. Elles ont été sélectionnées parmi une soixantaine d'autres, précédemment caractérisées

phénotypiquement (face aux divers facteurs abiotiques : températures, pH, salinité, résistance aux antibiotiques) et génétiquement et placées comme souches appartenant aux genres *Sinorhizobium* (Azib, 2020).

Tableau2: Provenance des souches rhizobiennes utilisées.

Espèce	Souches	Provenance	Plante hôte
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	O211	Ouargla	Luzerne
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	E141	El Oued	Luzerne
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	G543	Ghardaïa	Luzerne

Les souches bactériennes ont été cultivées à 28°C pendant 72h sur un incubateur agitateur (200 tpm) dans le milieu YEM (Yeast Extract Mannitol) (Vincent, 1970).

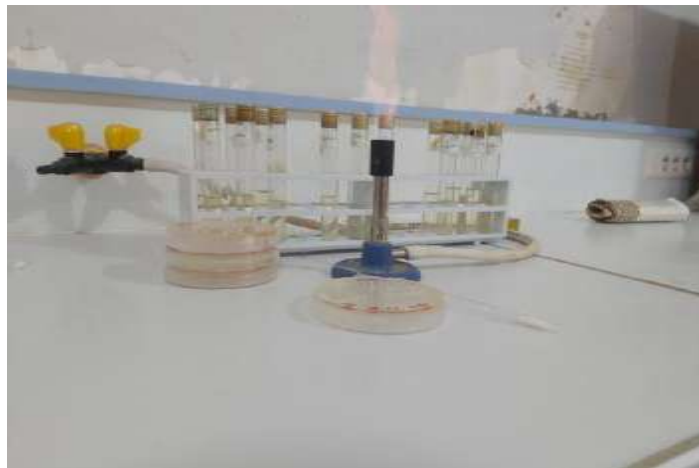


Photo 2: préparation de l'inoculum bactérien

II.2.3 Matériel végétal

Une population locale de luzerne originaire de l'oasis de Ouargla, où elle est cultivée depuis plusieurs décennies et est toujours largement utilisée par les agriculteurs locaux, a été choisie pour cette étude. La faculté germinative des graines était jugée satisfaisante avec un taux moyen de $91,5 \pm 5,1\%$ (Azib, 2020).

II.2 Méthodes

II.2.1 Préparation du sable de culture

Nous avons utilisé, comme substrat de culture, un sable provenant de la zone de Sidi Khouiled (région de Ouargla) qui avait subi une série d'opérations avant d'être utilisé, selon la méthode indiquée par Djerroudi et al. (2017), *in* Azib (2020). Le sable a été préalablement tamisé pour enlever toutes traces d'impuretés d'origine végétale ou animale puis lavé avec d'acide chlorhydrique (HCl) pendant 15 à 20 minutes pour éliminer les carbonates, les chlorures...etc. Ensuite, il a subi une série de lavage successifs à l'eau distillée (5 à 6 fois) afin d'éliminer toute trace de chlorure et mis à sécher à l'air libre.

Des mesures de pH (photo5). et de conductivité électrique (CE) (photo4).ont été effectuées avant et après traitement du sable comme décrit par Pansu et Gautheyrou (2003). Le classement des pH et CE de sol a été fait selon les échelles décrites par USSL Staff (1954) et Aubert (1978). A la fin, une stérilisation s'en est suivie dans un plateau galvanisé au four pasteur pendant 2 heures à 180°C.



Photo4: mesure de PH.



Photo3: agitation des extraits aqueux.

II.2.2 Désinfection et pérgermination des graines

La désinfection se fait selon la méthode de Somasegaran et Hoben (1985) (Photo6):

- Tout d'abord, les graines sont désinfectées l'éthanol (95%) pendant 10 à 30 secondes ;
- Ensuite, elles sont désinfectées superficiellement dans une solution d'hypochlorite de sodium pendant 10 min et rincées soigneusement 10 fois avec de l'eau distillée stérile ;

- Enfin, elles sont placées dans des boîtes stériles, et trempées dans l'eau distillée stérile pendant une nuit au réfrigérateur.



Photo 5: désinfection et pérégrination des

II.2.3 Préparation des jarres de Léonard

Des bouteilles d'eau minérales en plastique (0.33 l) sont choisies et coupées horizontalement en deux parties. Ces jarres sont lavées avec un détergent courant, puis désinfectées avec de l'eau javellisée pour éliminer toutes traces de bactéries. Les deux parties de la jarre sont reliées par un cordon de compresse stérile ce qui permet d'alimenter en continu, par capillarité, la partie supérieure en solution nutritive (photo7).



Photo 6: préparation des jarres de Léonard.

II.2.4 Préparation des pots

Des pots en plastique de forme carrée, d'un litre de volume et remplis de sable stérile ont été utilisés (photo 8).



Photo 7: préparation des pots.

II.2.5 Préparation de l'inoculum fongique

En conditions contrôlées, des suspensions sporales ont été préparées. A l'aide d'une anse de platine, nous avons prélevé des échantillons mycéliens de chaque souches, puisensemés dans des tubes à essais contenant 10 ml d'eau distillée stérile (photo 9).



Photo 8: l'inoculation fongique.

II.2.6 Préparation de l'inoculum bactérien

Dans des conditions d'asépsie générale, une colonie de chaque souche rhizobienne est prélevée par une anse de platine puis repiquée dans des tubes à essai (12 au total) contenant 10 ml de milieu YEM liquide avec 3 répétitions pour chaque souche, puis placées dans un incubateur agitateur à 200 tpm/min, à 28°C pendant 3 jours (photo10).



Photo 9 : préparation de l'inoculum bactérien.

II.2.6.1 Milieu de culture et solution nutritive utilisés

Nous avons utilisé la solution nutritive (Fahareus, 1957) et le milieu de culture YEM (Yeast Extract-Mannitol, Vincent, 1970). Leurs composition et sur les tableaux ci dessous (tableau 3 et 4).

Tableau 3: Composition de la solution nutritive de Fahareus.

Macroéléments	
Les composants	Quantité (g/l)
NaH₂PO₄	0.15
KH₂PO₄	0.1
CaCl₂	0.1
MgSO₄7H₂O	0.12
Citrate de ferre	0.005
Eau distillée	1000ml
Micro éléments	

Les composants	Quantité (g/l)
H_3BO_3	0.57
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.03
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.22
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.08
$H_2MoO_4 \cdot H_2O$	0.08
Eau distillée	1000ml



Photo 10: préparation du milieu de culture.

Tableau 4: les composants de milieux YEM

YEM (Yeast Extract-Mannitol, Vincent, 1970)	
Les composants	Quantité (g/l)
K_2HPO_4	0.5
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.2
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.1
Extrait de levure	0.6
Mannitol	10

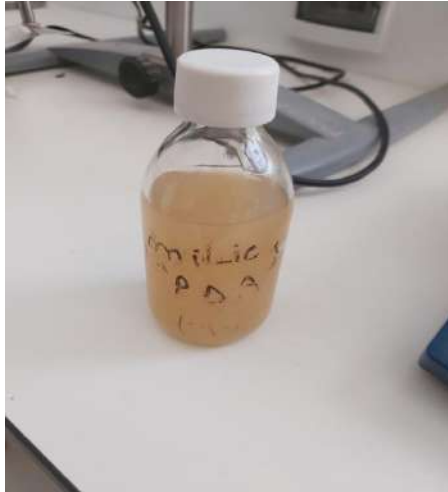


Photo 11: milieu YEM préparé.

II.3 Suivre d'experimentation

Dans les jarre de Léonard, le compartiment inférieur est rempli par la solution de Fahreus qui alimente le compartiment supérieur par remontée capillaire à travers le cordon de compresse. A chaque fois que le niveau de la solution nutritive diminue, un apport doit être effectué.

Les pots étaient arrosés tous les deux jours, pendant les deux premières semaines, avec 100 ml de la solution nutritive de Fahraeus exempte d'azote (Vincent, 1970) (Photo 13).



Photo 12: suivie de l'expérimentation.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

Le développement de nouveaux systèmes de production agricole qui renforcent l'utilisation des ressources naturelles écologiquement non polluants et qui permettent de réduire l'usage des intrants agricoles chimiques a permis de concentrer l'attention sur le rôle potentiel de la fixation biologique de l'azote et la lutte contre les maladies des plantes par l'utilisation de microorganismes bénéfiques associés à la rhizosphère des plantes, appelés agents de contrôle biologique.

Malheureusement, les deux expérimentations que nous avons mené n'ont pas aboutit à des résultats palpables fautes de mortalité inexplicable des plantules de luzerne (voire photos ci après).



Photos 13 : Mortalités des plantules de luzerne dans les jarres de Léonard.

Pour pallier à ce problèmes, nous avons opter pour l'étude de certains cas pratiques ayant le même objectif, ou presque, que celui assigné au départ à cette étude et qui était le biocontrôle de trois maladies fongiques causées par *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. et *Curvularia* sp. sur de la luzerne (*Medicago sativa* L.) par inoculation avec trois souches de *Sinorhizobium meliloti* (G535, E141 et O211) isolées de la même plante.

III.1 Cas général

Les phytopathogènes transmis par le sol continuent de représenter une menace majeure pour le développement et la productivité de l'agriculture dans le monde entier. Quatre grands groupes d'agents pathogènes des plantes sont présents dans le sol, mais seulement les champignons et les nématodes sont les principaux acteurs dans les sols, où peu de genres bactériens se révèlent être des agents pathogènes du sol (Raaijmakers et al., 2009). Les dommages économiques causés par pathogènes du sol dans le monde entier sont dévastateurs. Par exemple, Oerke (2005) a estimé qu'entre 2001 et 2003, une moyenne de 7 à 15 % de la population mondiale a été touchée par les maladies du sol. En 2003, une moyenne de 7 % à 15 % des pertes de récoltes peut être causée par des champignons et des bactéries pathogènes du sol dans de nombreuses cultures agricoles telles que le blé, l'orge et le coton., le riz, le maïs et le soja. De même, les pertes de récoltes dues à l'infection par les nématodes sont estimées à environ 100 milliards de dollars US dans le monde chaque année (Bird et Kaloshian, 2003). (Bird et Kaloshian, 2003).

Plusieurs méthodes de lutte contre les maladies des plantes ont été mises en œuvre pour protéger les cultures contre un large éventail de phytopathogènes. Ces méthodes comprennent la sélection de cultivars résistants, l'utilisation de pesticides chimiques, la rotation des cultures, les techniques culturales, l'application de fumier et l'ajout de compost ou d'autres nutriments (Whipps et Gerhardson, 2007). Actuellement, les pesticides chimiques et la culture de cultivars résistants sont les deux principales méthodes appliquées dans la protection des cultures (Vassilev et al., 2006).

En raison des préoccupations croissantes des communautés scientifique et publique concernant les problèmes de sécurité pour l'environnement et la santé liés à l'utilisation de produits chimiques dans la protection des plantes, certains produits chimiques ont été interdits (Whipps et Gerhardson, 2007). Cependant, l'utilisation de cultivars tolérants dans la

protection des cultures est encore limitée, notamment dans les cultures de fruits et légumes (Vassilev et al., 2006). Une méthode alternative et attrayante pour lutter contre les maladies des plantes est l'utilisation de microorganismes bénéfiques associés à la rhizosphère des plantes, appelés agents de contrôle biologique (ACB) (Whipps et Gerhardson, 2007).

De nombreux MCR sont connus pour réduire l'incidence et la gravité des maladies des plantes. *Pseudomonas* spp. et *Bacillus* spp. sont les MCR bactériens prédominants, tandis que *Trichoderma* spp. est le MCR fongique le plus important (Gerhardson, 2002). Les endophytes bactériens présentent également des activités antagonistes contre un large spectre d'agents pathogènes fongiques (Berg et Hallmann, 2006).

Les modes d'action des MCR bactériens ont été largement étudiés pour les bactéries rhizosphériques (par exemple, P +GPR) (Whipps, 2001). On suppose que les endophytes bactériens utilisent des mécanismes similaires pour le contrôle des agents pathogènes des plantes (Berg et Hallmann, 2006). Certains de ces mécanismes sont bien établis pour les bactéries endophytes antagonistes telles que la résistance systématique induite (Kloepper et Ryu, 2006), tandis qu'il reste encore beaucoup à apprendre sur les autres modes d'action utilisés, comme l'antibiose, la compétition et la lyse (Berg et Hallmann, 2006). Les MCR bactériens contrôlent les maladies des plantes par différents mécanismes, dont : (1) la suppression des agents pathogènes par la production de métabolites antimicrobiens (antibiose) ; (2) la compétition pour les sites de colonisation sur les racines et les ressources limitées dans la rhizosphère ; la compétition pour le fer par la synthèse de sidérophores qui limitent l'accès des agents pathogènes au Fe ; (3) la résistance systématique induite (RSI) de leurs plantes hôtes ; (4) la production de cyanure d'hydrogène (HCN) ; (5) le parasitisme où les bactéries bénéfiques inhibent les agents pathogènes des plantes par la production d'enzymes extracellulaires comme la β -glucanase, la cellulase, la chitinase, la pectinase et la protéase qui peuvent lyser les parois cellulaires des agents pathogènes ; et (6) la dégradation des toxines produites par les agents pathogènes des plantes (Whipps, 2001 ; Banerjee et al. , 2006).

III.2 Etude de cas 1:

Intitulé: *Sinorhizobium meliloti* peut protéger *Medicago truncatula* de l'infection par *Phoma medicaginis*.

Auteurs: Mrabet et al. (2011).

III.2.2 Objectif

La présente étude visait à évaluer l'efficacité des souches de *Sinorhizobium meliloti*, un rhizobium nodulant *Medicago truncatula*, i) pour inhiber la croissance *in vitro* de *Phoma medicaginis* et ii) pour protéger la plante hôte contre le pathogène.

III.2.3 Matériel et méthodes

III.2.3.1 Souches de *Sinorhizobium meliloti* et conditions de croissance

Dix-sept souches de *S. meliloti* isolées de *M. truncatula* et *M. laciniata* qui croissent dans des sols tunisiens (Zribi et al., 2005 ; Badri et al., 2007) ont été utilisées dans cette étude. Les souches ont été cultivées sur milieu YMA avec rouge congo (Mhamdi et al., 2002) à 28°C.

III.2.3.2 Souches fongiques et conditions de croissance

Les souches de *P. medicaginis* Pm4, Pm7, Pm8, Pm12, et Pm13, isolées à partir de *M. truncatula* poussant spontanément dans des sols tunisiens (Djébali,2008), ont été cultivées sur de milieu PDA à 25°C. Les conidies fongiques ont été produites sur milieu Sanderson & Srb (Dhingra et Sinclair,1995).

III.2.3.3 Matériel végétal et conditions de croissance

La lignée JA17 de *M. truncatula* a été utilisée dans les essais de biocontrôle. Les graines stérilisées en surface ont été germées comme décrit par Djébali et al. (2009). Les graines germées ont été cultivées sur le milieu M (Bécard et Fortin, 1988) additionné de KNO₃(80 mg L⁻¹) comme source d'azote. Cinq plantules par boîte de Pétri carrée (12×12×1,5 cm) ont été cultivées à 25°C et à une photophase de 16 h.

III.2.3.4 Tests de pathogénicité et de bioprotection

Les souches de *Sinorhizobium meliloti* 10.16/R6 et 5M6 ont été utilisées comme inoculants rhizobiens dans les essais de bioprotection de *M. truncatula* contre les souches Pm4 et Pm8 de *P. medicaginis*.

Les traitements suivants ont été testés: (i) plantes non inoculées, (ii) plantes inoculées avec la souche 10.16/R6 ou 5M6 de *S. meliloti*, (iii) plantes inoculées avec les souches Pm4 ou Pm8 de *P. medicaginis* et (iv) des plantes co-inoculées avec des souches de *S. meliloti* (10.16/R6 ou 5M6) et de *P. medicaginis* (Pm4 ou Pm8). 50 μL de la culture rhizobienne (10^8 ufc mL^{-1}) ont été inoculées à la surface des racines des plantules germées dans des boîtes de Pétri carrées (12×12×1,5 cm). Vingt-quatre heures plus tard, 10 μL de chaque suspension conidienne de *P. medicaginis* (10^6 conidies mL^{-1}) ont été inoculées au milieu de chaque racine. Les plantes ont été incubées dans une chambre de croissance en photophase de 16 h à 25°C.

III.2.3.4.1 Symptômes enregistrés

Le développement des plantes (longueur des racines, longueur des tiges, biomasse racinaire et biomasse aérienne) et les paramètres de la maladie des plantules cultivées (pourcentage de pourriture et mortalité des plantes) ont été enregistrés 21 jours après l'inoculation avec les pathogènes. Le pourcentage de pourriture a été calculé comme suit :

longueur de pourriture (%) = longueur de pourriture sur tige et racine / (longueur de la racine + longueur de la tige) × 100.

Les données ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) à l'aide du logiciel Statistica version 5.1 (www.statsoft.com) et les moyennes des paramètres ont été comparées à l'aide du test de Duncan (P=0,05).

III.2.4 Résultats

III.2.4.1 Croissance de *Phoma medicaginis*

III.2.4.1.1 Effets des isolats de *Sinorizobium* sur la croissance de *Medicago truncatula*

Les résultats relatifs aux paramètres de croissance de *M. truncatula* JA17 n'ont pas été augmentés par l'inoculation de *S. meliloti*. La longueur de la racine, le poids frais de la racine

et le poids frais des parties aériennes de *M. truncatula* ont été réduits de manière significative par les souches Pm4 ou Pm8 de *P. medicaginis*, tandis que l'inoculation des souches 10.16/R6 et 5M6 de *S. meliloti* sur des plantules co-inoculées avec *P. medicaginis* a donné des plantules comparables à celles sans inoculation de *P. medicaginis*. L'effet promoteur donné par la souche 10.16/R6 de *S. meliloti* était généralement plus important que celui de la souche 5M6.

III.2.4.1.2 Inhibition par *Sinorhizobium* du développement de la maladie de *P. medicaginis* sur *Medicago truncatula*

L'inoculation par les souches Pm4 ou Pm8 de *P. medicaginis* sur *M. truncatula* JA17 a donné lieu à une pourriture complète des racines et des tiges, entraînant une mortalité des plantes proche de 100 % (Figure 3A et B). Cependant, dans le système de co-inoculation *Sinorhizobium-P. medicaginis*, le *S. meliloti* a réduit la longueur de la pourriture des racines et des tiges à 64,8 % lorsque la souche 10.16/R6 était utilisée. Cette souche a également réduit la mortalité des plantes à 80 % du total des plantules. La souche 5M6 a donné une longueur légèrement inférieure de tissus en décomposition sur les plantules.

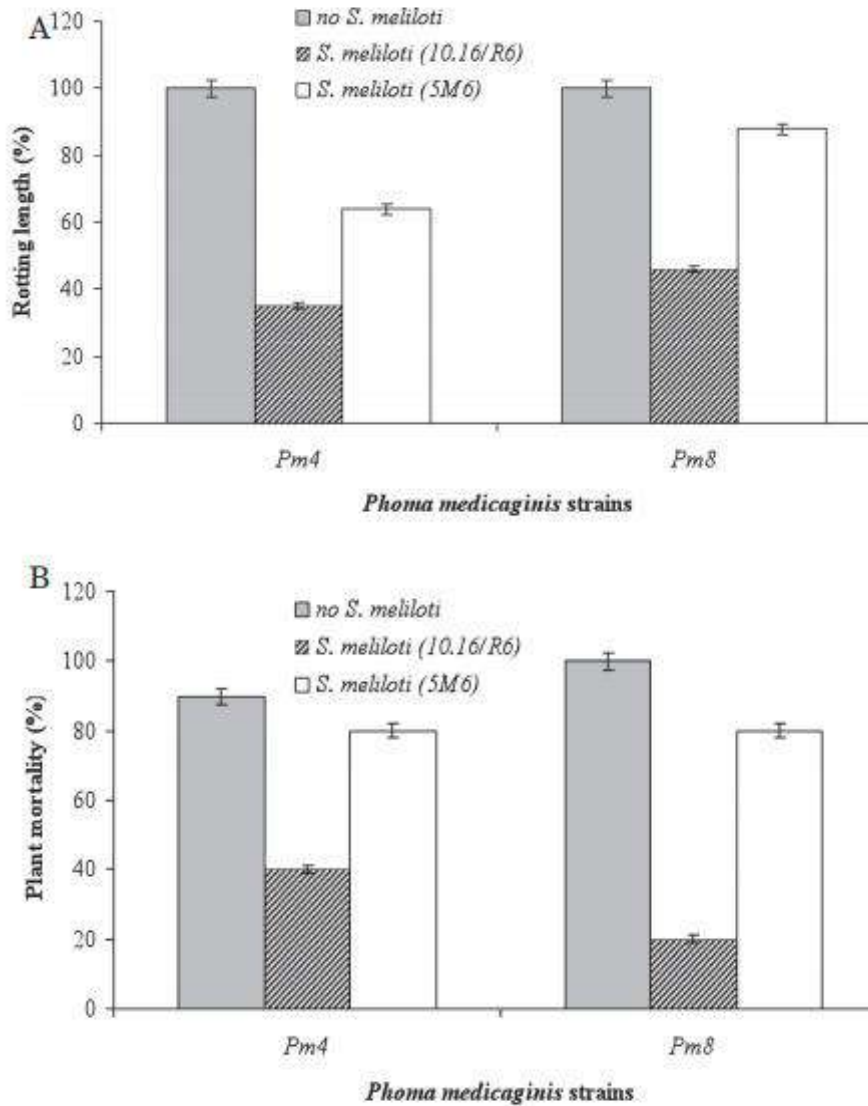


Figure 11: Développement des symptômes de la maladie chez *Medicago truncatula* JA17 (à 21 jours) dans un test de l'activité de biocontrôle de *Sinorhizobium meliloti* contre *Phoma medicaginis*. A, développement de la longueur de pourriture dans les plantules infectées par *P. medicaginis* (Pm4 ou Pm8) en présence ou en l'absence de souches de *S. meliloti* ayant différentes activités contre *P. medicaginis* ; B, mortalité des plantes en présence ou en absence des souches de *S. meliloti*. Les plantules sans inoculation avec *P. medicaginis* ont survécu sans aucun symptôme de pourriture. Chaque traitement correspond à 15 répétitions. Les barres représentent les erreurs standard.

III.2.5 Discussion

La fréquence de la résistance à *P. medicaginis* au sein des populations de *Medicago* est faible, et des variétés résistantes efficaces ne sont pas disponibles dans le commerce (Gray et al., 1990). La lutte biologique de l'agent pathogène est donc une stratégie de lutte qui peut permettre une gestion efficace des maladies causées par ce pathogène. *Sinorhizobium meliloti* a été suggéré comme un agent potentiel de biocontrôle contre plusieurs agents pathogènes tels que *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina* (Ehteshamul-Haque et Ghaffar, 1993 ; Anis et al., 2010) et *Rhizoctonia solani* (Omar et Abd-Alla, 1998) mais n'a pas été étudiée précédemment pour le biocontrôle de *P. medicaginis*. La capacité des souches de *S. meliloti* isolées de *Medicago sp.* cultivées dans des sols tunisiens à inhiber la croissance *in vitro* de *P. medicaginis* et la bioprotection des plantes hôtes ont été étudiées dans ce travail.

L'inoculation des plantes affectées par le pathogène avec la souche de *S. meliloti* 10.16/R6, qui était antagoniste de *P. medicaginis*, a donné une amélioration significative des paramètres de croissance, de la productivité et de l'efficacité. Une amélioration significative des paramètres de croissance, notamment la longueur des racines et la biomasse des racines et des pousses. La souche non antagoniste *S. meliloti* 5M6 de *S. meliloti* a également augmenté ces paramètres de croissance, mais dans une moindre mesure que la souche 10.16/R6.

Ces améliorations pourraient être dues à la réduction de l'accès de *P. medicaginis* aux tissus végétaux, puisque la colonisation des racines est décrite comme un facteur clé du processus de biocontrôle (Validov et al., 2007). Il a été signalé que les bactéries forment des biofilms racinaires autour des racines et empêchent l'invasion par d'autres microorganismes (Gamalero et al., 2003 ; Postma, 2010).

Par conséquent, la réduction de la susceptibilité des racines au pathogène par la souche 10.16/R6 de *S. meliloti* pourrait être le résultat de deux mécanismes: l'inhibition de la croissance du champignon et la diminution de sa capacité d'invasion des racines, car les rhizobia sont considérés comme des colonisateurs efficaces des racines (Bally et Elmerich, 2007).

Dans cette expérience, l'inoculation avec la souche 10.16/R6 de *S. meliloti* a réduit la longueur de pourriture des racines et des tiges de 64,8 %. La souche 5M6 de *S. meliloti* a aussi légèrement diminué la longueur de pourriture par rapport aux plantules inoculées avec *P. medicaginis* seul, mais dans une moindre mesure que la souche 10.16/R6. Ceci suggère que la

colonisation des sites d'infection sur les racines de l'hôte est un possible mécanisme d'activité (Barea et al., 2005). De plus, l'inoculation de *M. truncatula* JA17 avec des souches de *P. medicaginis* seules a entraîné une mortalité de 100 % des plantes. L'inoculation avec la souche 5M6 de *S. meliloti* 5M6 n'a pas été associée à une amélioration de la viabilité de la plante, mais la souche *S. meliloti* 10.16/R6 a réduit de 80 % la mortalité des plantes inoculées.

Il est connu que dans les conditions de terrain, *P. medicaginis* est communément associé au sol, le plus souvent comme colonisateur de débris végétaux (Rodriguez, 1990). L'utilisation de bactéries de la rhizosphère, comme *S. meliloti*, interagissant directement avec les plantes hôtes en tant qu'agents antagonistes des pathogènes fongiques est une approche intéressante du biocontrôle comme indiqué par Omar et Abd-Alla (1998). Il a été remarqué qu'il existe une relation étroite entre l'antibiose *in vitro* et la suppression des maladies sur les plantes. D'autres rapports de recherche ont indiqué l'utilité des souches rhizobiennes pour réduire la susceptibilité du pois chiche de soja, de gombo et de tournesol à *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.*, *Drechslera sp.* et *Curvularia sp.* dans des essais en serre (Omar et Abd Alla, 1998 ; Essalmani et Lahlou, 2003 ; Sharif et al., 2003 ; Arfaoui et al., 2005).

III.3 Etude de cas 2:

Intitulé: La double inoculation de la luzerne (*Medicago sativa* L.) avec *Funnelliformis mosseae* et *Sinorhizobium medicae* peut réduire la flétrissure causée par le *Fusarium*.

Auteurs: Wang et al. (2019)

III.3.1 Objectif

Cette étude a été conçue pour évaluer les effets de la co-inoculation des AMF (arbuscular mycorrhiza fungus) et du rhizobium sur la croissance de la luzerne, l'absorption de l'azote et du phosphore et le flétrissement causé par *F. oxysporum*. Les enzymes antioxydantes et les hydrolases (la β -1,3-glucanase et la phénylalanine ammonialyase (PAL)) ont été testées pour évaluer l'étendue des dommages causés aux plantes ainsi que leur capacité de résistance. Des hormones (l'acide abscissique (ABA), l'éthylène (ETH) et d'autres substances (le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et la lignine)) ont été détectées pour déduire la réponse au stress de la luzerne infectée par les trois microorganismes. Les auteurs ont émis l'hypothèse que (i) l'inoculation avec *F. mosseae* ou *Sinorhizobium medicae* seul améliore la

croissance des plantes et la santé générale, et augmente la résistance des plantes à *F. oxysporum* en augmentant la capacité de stress oxydatif et les niveaux des signaux de défense des plantes dans la luzerne, et (ii) ces effets positifs seraient renforcés par la co-inoculation avec *F. mosseae* et *S. medicae* par rapport aux inoculations séparées.

III.3.2 Matériel et méthodes

III.3.2.1 Matériaux végétaux et fongiques

Medicago sativa cv. Longdong, un cultivar largement cultivé en Chine, a été utilisé dans cette étude. Les graines ont été stérilisées en surface dans de l'hypochlorite de sodium à 3 % pendant 30 s, puis rincées cinq fois avec de l'eau stérile (Li et al. 2018). Les graines stérilisées ont ensuite été placées sur deux morceaux de papier filtre humide dans des boîtes de Pétri en verre de 9 cm de diamètre. Le papier filtre et les boîtes de Pétri ont été stérilisés à 121°C pendant 30 minutes. Les graines ont été incubées à 25°C pendant 48 h pour germer. Huit graines germées ont été plantées dans chaque pot. Deux semaines après l'émergence, les plantules ont été éclaircies à six plantules par pot. L'AMF utilisé dans cette étude était *F. mosseae* (BGC XJ08A), fourni par la Bank of Glomeromycota de Chine (BGC) (Beijing, Chine). Le *F. mosseae* a été cultivé en pot sur du trèfle blanc (*Trifolium repens*) dans le même mélange de sol que celui utilisé dans l'expérience. Le nombre de spores de *F. mosseae* utilisé était de $\sim 100 \text{ g}^{-1}$ de sol sec. L'inoculum était composé de substrat et de fragments de racines de *T. repens* coupés en longueurs d'environ 05 cm (100 g par pot) et mélangés au sol pour créer les traitements AMF. Les plantes témoins non inoculées (NM) étaient composées de 100 g de sol stérilisé, le même que celui utilisé pour le substrat de *F. mosseae*. Le *Sinorhizobium medicae* (ACCC 17500) utilisé dans cette étude a été fourni par le College of Grassland Science, Gansu Agricultural University et a été inoculé sur milieu YMA pour la propagation et le stockage. Après une incubation à 28°C pendant 2 jours, les plaques ont été placées dans un réfrigérateur à 4°C et scellées avec un parafilm. Ensuite, le *S. medicae* a été transféré dans un milieu de culture incliné pour l'activation. Après une incubation à 28°C pendant 48 h, la souche a été transférée dans le milieu de culture YMA (200 ml) dans des flacon coniques. Les flacons ont été placés dans un agitateur thermostatique à une température de 2°C, pendant 1 semaine pour atteindre la phase de croissance logarithmique. La concentration résultante ($2,4 \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$) de l'inoculum a été standardisée avec un colorimètre sous OD600 (Chakraborty and Purkayastha, 1984).

Deux semaines après l'émergence des semis, 20 ml de suspension de rhizobium ont été ajoutés au sol dans les traitements inoculés (S+), et la même quantité d'eau stérile a été ajoutée aux traitements témoins (S). La souche mono-conidienne de *F. oxysporum* utilisée dans cette étude a été isolée des racines de plantes de luzerne dans des champs présentant des symptômes de flétrissement et de pourriture des racines. Après l'isolement, des cultures pures de *F. oxysporum* a été cultivé sur milieux PDA (Potato Dextrose Agar) et CLA (Carnation Leaf Agar) (Nelson et al. 1983). La culture sur la PDA est apparue initialement blanche et est devenue progressivement rouge pourpre, tandis que la culture sur la CLA est apparue blanche (Fig. S2). Après 14 jours de culture à 30°C, des spores ovales et en forme de faucille ont été observées au microscope. Les conidies ont été récoltées en ajoutant de l'eau stérile à des boîtes de pétri contenant des colonies de *F. oxysporum* qui avaient été incubées à 25°C dans l'obscurité pendant 15 jours. La concentration de l'inoculum a été mesurée avec un hémocytomètre et a été ajustée à environ 2.10^6 conidies par ml. Trois semaines après l'émergence des semis, 15 ml de suspension de spores ont été ajoutés au sol de chaque pot de traitement inoculé (F+). La même quantité d'eau stérile a été ajoutée au traitement témoin non inoculé à la place de la suspension de spores (F).

III.3.2.2 Milieu de croissance des plantes

Le sol a été collecté dans le mont Xinglong (sol semi-luvisol, système de taxonomie des sols de l'USDA) et le mont Cuiying (sol utochnept, système de taxonomie des sols de l'USDA) dans la ville de Lanzhou, province de Gansu, Chine (USDA, Soil Survey Staff, 1999). Le milieu mixte était composé de 25% de sol de la montagne Xinglong, 25% de sol de la montagne Cuiying et 50% de sable. Tous les composants ont été tamisés à travers un tamis de 2 mm, puis séchés à température ambiante pendant 6 heures. Les mélanges de sol et de sable ont été stérilisés deux fois par autoclavage à 121°C pendant 1 heure, avec un intervalle de 24 heures entre les stérilisations. Enfin, le milieu du sol mélangé a été séché dans un four à 110°C pendant 36 h. Le milieu contenait 146 mg g⁻¹ de N total (Feng et al. 2011) et 068 mg g⁻¹ de P total (Zhao et al. 2009), et avait un pH de 7.6. Un total de 12 kg du milieu a été ajouté à des pots de 12 cm x 18 cm x 15 cm (base 9 hauteur 9 sommet).

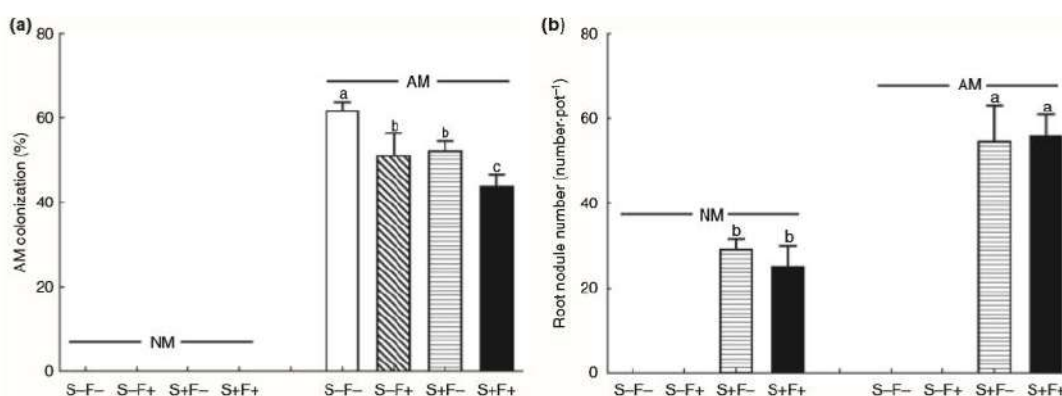
III.3.2.3 Étude en serre

Une expérience incluant les trois facteurs, c'est-à-dire AM/ NM (avec/sans AMF), S+/S (avec/sans rhizobium), F+/F (avec/sans *F. mosseae*), a été conçue et mise en œuvre dans

un pot contenant six plantules. Les huit traitements étaient les suivants : NMSF (sans AMF, rhizobium ou *Fusarium* ; le contrôle), NMSF+ (avec *Fusarium* mais sans AMF ni rhizobium), NMS+F (avec rhizobium mais sans AMF ni *Fusarium*), NMS+F+ (avec AMF et rhizobium mais sans *Fusarium*), AMSF (avec AMF mais sans rhizobium ni *Fusarium*), AMSF+ (avec AMF et *Fusarium* mais sans rhizobium), AMS+F (avec AMF et rhizobium mais sans *Fusarium*) et AMS+F+ (avec AMF, rhizobium et *Fusarium*). Quatre répétitions ont été effectuées pour chaque traitement. Pour éliminer les facteurs externes, les 32 pots ont été placés au hasard dans la serre et maintenus à 18-25°C avec une humidité de 65-80% pendant toute la période de croissance.

III.3.3 Résultats

Il n'y avait pas d'interaction significative dans l'activité SOD et la teneur en MDA entre les traitements par *F. mosseae*, *S. medicae* et *F. oxysporum* dans les pousses de luzerne (tableau S1, fig. S6b,c). Cependant, pour les racines de la luzerne, l'activité SOD a été augmentée de façon significative par l'inoculation avec *F. mosseae* et *S. medicae* (Fig. 4a ; Tableau 1), alors que les plantes sans *S. medicae* (S) avaient une activité SOD beaucoup plus faible dans le traitement NM. L'activité POD était similaire dans la luzerne parmi les traitements AM (Fig. S6a). Seuls SF+ (dans le traitement NM et AM) et S+F (dans le traitement AM) avaient une teneur en MDA inférieure à celle de NMSF ($P < 005$; Fig. 4b).



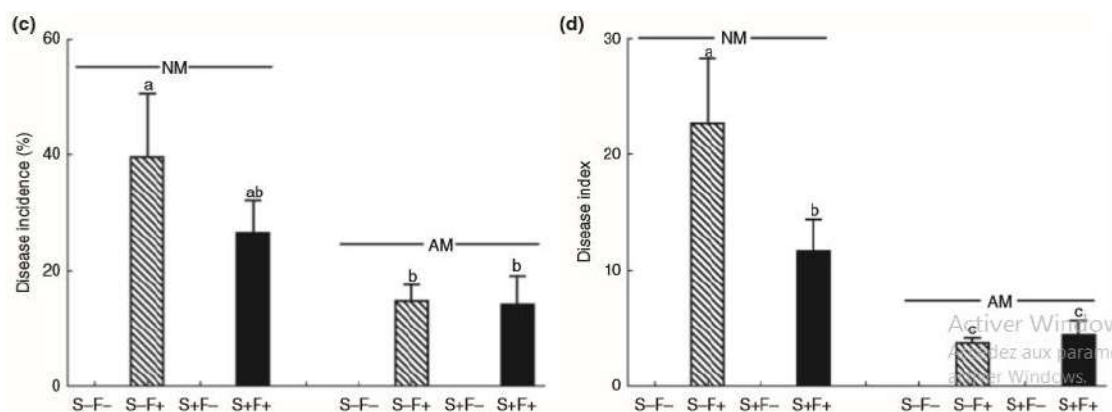


Figure 12: colonisation par AM (a), nombre de nodules racinaires (b), incidence de la maladie (c) et indice de maladie (d) de la luzerne (*Medicago sativa* L.) colonisée par *Funnelliformis mosseae* (AM) ou non-mycorhizienne (NM), inoculée avec (S+) et sans *Sinorhizobium medicae* (S), infectée par *Fusarium oxysporum* (F+) et sans *F. oxysporum* (F) à la récolte.

III.3.4 Discussion

Dans cette étude, les enzymes antioxydantes, les enzymes hydrolytiques, les hormones et d'autres substances végétales impliquées dans la défense contre les pathogènes ont été systématiquement mesurées pour déterminer si *F. mosseae* et *S. medicae* interagissent pour avoir un impact sur la croissance et la résistance de la luzerne au flétrissement de *F. oxysporum*.

Les résultats ont révélé l'interaction complexe de *F. mosseae* et *S. medicae* et leurs effets sur la physiologie et la biochimie de leurs plantes hôtes, sous le stress créé par le pathogène *F. oxysporum*. Les résultats de cette étude ont largement étayé les hypothèses selon lesquelles l'inoculation avec *F. mosseae* et/ou *S. medicae* améliorera l'efficacité des plantes hôtes.

la croissance de la plante, sa santé générale, et augmenter la résistance de la plante au pathogène en améliorant la capacité de stress oxydatif et en ajustant les niveaux d'hormones et d'autres substances impliquées dans la défense contre les pathogènes dans la luzerne. Ces effets positifs ont été renforcés par la co-inoculation. De plus, lorsque la luzerne a été envahie par *F. oxysporum*, la plupart de ses systèmes de défense ont été activement mobilisés pour faire face à l'invasion, rendant les relations symbiotiques avec *F. mosseae* et *S. medicae* plus

prononcées. Les symbiotes, tels que les AMF et les rhizobiums, peuvent renforcer la capacité d'une plante à faire face aux maladies. Cependant, l'invasion de *F. oxysporum* suit un certain processus, spécifiquement, les niveaux d'enzymes, d'hormones et d'autres substances dans les racines ont montré un changement plus significatif que ceux dans les pousses. Ensemble, ces réactions ont également provoqué des symptômes sur les feuilles, tels que le jaunissement et le flétrissement, en raison des dommages causés par les racines. Cela a permis de mieux comprendre les mécanismes des effets des AMF et des rhizobia sur les plantes exposées aux pathogènes racinaires.

Les résultats ont également permis d'évaluer le potentiel de l'utilisation des AMF et des rhizobiums comme agents de biocontrôle pour la gestion des maladies transmises par le sol. La croissance de la luzerne a été négativement affectée par *Fusarium oxysporum*, qui a entraîné le jaunissement des plantes et un léger brunissement des racines des plantes, indiquant que le champignon était fortement pathogène pour la luzerne, ce qui est en accord avec les recherches précédentes (Singh et al. 2014). La colonisation mycorhizienne a augmenté de façon significative la hauteur des plantes, la longueur des racines et la valeur SPAD (Soil Plant Analysis Development), ainsi que la biomasse des pousses et des racines indépendamment de la présence du pathogène, ce qui indique que les AMF peuvent réduire les impacts négatifs sur la luzerne subissant un stress causé par *F. oxysporum* en améliorant la situation sanitaire générale de la luzerne. Ceci a également été confirmé par les concentrations de N et P et l'incidence de la maladie dans les cultures expérimentales.

III.4 Etude de cas 3

Intitulé: Effets de la double inoculation d'AMF et de rhizobium sur la pourriture des racines de la luzerne (*Medicago sativa* L.) causée par *Microdochium tabacinum*.

Auteurs: Ping Gao et *al.*(2018).

III.4.1 Objectif

Ce travail avait pour objectif de tester les effets combinés de champignons mycorrhiziens à arbuscules (AMF) et du rhizobium sur la pourriture des racines de la luzerne causée par *M. tabacinum*.

III.4.2 Matériel et méthodes

III.4.2.1 Matériel biologique

Les graines de luzerne (*Medicago sativa* cv Longdong) originaire de Gansu, en Chine, ont été utilisées. Les graines ont été stérilisées en surface dans de l'oxydol à 10% pendant 10 minutes, puis lavées trois fois avec de l'eau distillée stérilisée, et enfin laissées en incubation à 25 °C pendant 48 heures pour germer. Six graines germées ont été plantées dans chaque pot et éclaircies à 4 plantules après 1 semaine.

Funnelliformis mosseae et *Glomus tortuosum* ont été utilisées comme inoculum fongique des plantes de luzerne à partir de cultures en pot de ces AMF sur *Trifolium subterraneum*.

Sinorhizobium medicae a été utilisé comme inoculum bactérien de la luzerne à une concentration de $2,1 \times 10^8$ ufc/mL de l'inoculum. 5 mL de la suspension ont ensuite été arrosés sur chaque plant de luzerne de 7 jours, la même quantité d'eau distillée stérile ont été ajoutés aux traitements non inoculés.

Microdochium tabacinum a été utilisé, quant à lui, comme agent pathogène de la luzerne. 2,5 mL de suspension de spores (3×10^6 conidies par ml) ont été ajoutés à chaque luzerne de 6 semaines, la même quantité d'eau distillée stérile a été ajoutée aux traitements non inoculés.

III.4.2.2 Croissance des plantes et récolte

L'expérience a été menée dans une serre contrôlée. Les plantes ont été arrosées avec de l'eau de robinet tous les deux jours. Deux fois par semaine, une solution nutritive Hogland modifiée (sans P) (Duan et al. 2011) a été appliquée aux pots pendant l'expérience. Les plantes ont été récoltées 3 semaines après l'inoculation avec *M. tabacinum*.

À la récolte, le pourcentage de décoloration de la luzerne a été déterminé en comptant toutes les parties aériennes des plantes. Le site longueur de la tige et le nombre de branches de chaque plante ont été déterminés. Les pousses ont ensuite été coupées des plantes et divisées en trois sous-échantillons d'environ 0,6 g de poids frais.

Le nombre de plantes dans chaque catégorie de gravité de la maladie a été enregistré à travers le calcul de l'indice de maladie (DI)

Les nodules ont été comptés par pot respectivement et les racines ont été conservées dans du formol-acéto-alcool pour déterminer.

Les échantillons de pousses et de racines sèches ont été broyés et tamisés pour déterminer les concentrations de N, P.

III.4.3 Résultats

III.4.3.1 Apparition de la maladie et nodulation

L'inoculation avec les AMF a augmenté le nombre de nodules de 19 à 52. Cependant, l'infection par les pathogènes a réduit le nombre de nodules de luzerne. L'inoculation avec *S. medicae* a légèrement augmenté la colonisation par les champignons MA.

Il a été constaté que l'infection de l'agent pathogène a provoqué une décoloration de la luzerne de 8 à 15 % et la co-inoculation avec les AMF et le *S. medicae* a réduit la décoloration des plantes de 47 %, tandis que *S. medicae*, seul, n'a eu aucun effet sur l'apparition de la maladie chez les plantes. L'indice de maladie était compris entre 0 et 0,75. L'AMF et *S. medicae* ont eu un effet similaire sur l'envahissement du pathogène et la co-inoculation a légèrement réduit la gravité de la maladie de la pourriture des racines.

III.4.3.2 Croissance des plantes

La luzerne a répondu positivement à la colonisation par les AMF traduit par l'augmentation de la biomasse végétale chez la luzerne, et cela qu'ils aient été inoculés individuellement ou en combinaison. La luzerne a montré une réponse négative à l'infection par *M. tabacinum*, notamment en ce qui concerne la croissance des racines, qui a été significativement réduite par l'utilisation de *M. tabacinum*. Les rapports racine/pousse (R/P) ont été diminués par l'infection par *M. tabacinum*, et la co-inoculation avec les AMF et de rhizobium a augmenté la longueur des racines pivotantes des plantes.

III.4.3.3 Concentrations de N et de P dans les plantes

L'inoculation de *S. medicae* a seulement augmenté l'absorption de N de la luzerne alors qu'elle n'a eu aucun effet sur l'absorption de P par la plante. La co-inoculation de l'AMF et de *S. medicae* a eu des interactions combinées et a amélioré l'absorption de P et de N par la luzerne dans tous les traitements. L'infection du pathogène a significativement diminué la concentration de N des pousses et des racines et aussi la concentration de P des pousses.

III.4.4 Discussion

Dans cette recherche, nous avons d'abord étudié l'effet des AMF et du rhizobium sur une nouvelle maladie de pourriture des racines de la luzerne en Chine, *M. tabacinum*, qui a réduit de manière significative la concentration de N, P, le poids sec total de la plante et a provoqué une décoloration de la plante.

stade de croissance et dans le champ de luzerne établi depuis plus de 2 ans. Nous avons constaté que *M. tabacinum* ne réduisait pas le nombre de branches ni la longueur des pousses (données non présentées), mais les plantes infectées par le pathogène avaient des racines fines et un poids sec des racines inférieur à celui des plantes infectées. mais les plantes infectées par le pathogène avaient des racines fines et un poids sec des racines inférieur à celui des plantes non infectées. par rapport aux plantes non infectées, ce qui indique que le pathogène a réduit le poids sec des racines des plantes en modifiant leur morphologie. Nous avons ré-isolé *M. tabacinum* à partir des racines de toutes les plantes inoculées. Ce site Cela suggère que la maladie peut se produire dans des conditions environnementales appropriées sans longue période de latence comme dans les conditions de terrain.

La présente étude a fourni des informations précieuses sur l'occurrence de *Microdochium tabacinum* sur la luzerne La colonisation mycorhizienne a augmenté de

manière significative la croissance, y compris la longueur des pousses, la longueur des racines et le nombre de branches, ainsi que le poids sec des pousses et des racines. branches ainsi que le poids sec des pousses et des racines de la luzerne.

Les rhizobiums sont capable d'établir des associations symbiotiques avec leur plante hôte spécifique plante hôte et d'absorber l'azote atmosphérique (Scheublin et *al.* 2004). Les résultats ont montré que l'inoculation de rhizobium a augmenté la concentration de N de la plante, ce qui a entraîné une légère augmentation de l'activité de la plante, mais n'a eu aucun effet sur la résistance des plantes aux maladies. L'infection avec l'agent pathogène *M. tabacinum* a réduit de manière significative le nombre de nodules dans tous les traitements, ce qui a conduit à une concentration de N plus faible.

dans tous les traitements, ce qui a conduit à une concentration moindre de N dans les plantes. Ceci est en contradiction avec les résultats de Sawada (1982), qui a rapporté que l'inoculation de *Rhizobium meliloti* a diminué la pourriture des racines de *F. oxysporum*. la pourriture des racines de *F. oxysporum*, la nodulation était réduite par le pathogène dans l'alfalfa. par le pathogène dans la luzerne. Les différences de nos résultats avec d'autres indiquent la diversité fonctionnelle des plantes et des micro-organismes. (Wehner et al. 2010).

Les nodules peuvent fixer l'azote atmosphérique. l'efficacité du processus est principalement déterminée par la teneur en de la plante hôte, car un apport approprié de nutriments phosphoreux est indispensable à la croissance de la plante hôte. phosphoreux est indispensable à la croissance de la plante hôte (Sánchez-Díaz et al. 1990). Ce n'est que lorsque le phosphore organique

sous l'action de la phosphatase du sol, est hydrolysé en phosphate inorganique. phosphate inorganique, il peut être absorbé et utilisé par les racines.

Cette expérience a montré que les AMF pouvaient améliorer significativement les concentrations de P de la luzerne, ce qui indique que l'inoculation avec les AMF peut augmenter la rhizosphère. AMF peut augmenter l'activité phosphatase du sol rhizosphérique. Tarafdar et Jungk (1987) ont observé une augmentation considérable de la phosphatase acide et alcaline.

de l'activité de la phosphatase acide et alcaline dans toutes les quatre interfaces sol-racine après inoculation avec les AMF. Des recherches antérieures sur des espèces de

légumineuses telles que la luzerne (Nielsen et Jensen 1983 ; Azcon et El-Atrash 1997) et le soja (Ross 1971 ; Xie et al. 1995) ont montré que le rhizobium ou AM peuvent affecter de manière significative la croissance des plantes, l'absorption des nutriments.

CONCLUSION

Conclusion

L'objectif assigné à ce travail de recherche est l'étude du biocontrôle, dans des conditions semicontrôlées, de certaines maladies fongiques (*Fusarium*, *Alternaria* et *Curvilaria*) de la luzerne (*Medicago sativa* L.) par inoculation avec trois souches de *Sinorhizobium meliloti* (G535, E141 et O211) isolées de la même plante.

Comme les deux expérimentations que nous avons mené n'ont pas aboutit à des résultats palpables après que les plantes de luzerne périssaient pour des raisons qu'on a pas pu décrire, nous avons rajouté certains cas pratiques ayant un objectif similaire au notre.

Par association avec des bactéries rhizosphériques appelées rhizobium, les légumineuses ont le pouvoir d'établir une association symbiotique fixatrice d'azote atmosphérique (N₂) au sein de structures racinaires appelées nodules, d'où leur importance. Cette caractéristique les rend indépendantes de source d'azote sous forme de nitrates ou d'ammoniaque présents dans le sol ou apportés par des engrais d'un côté'. D'un autre côté l'inoculation de rhizobium pourrait être une bonne solution pour l'amélioration de la fixation symbiotique, les paramètres de croissance de la plante ainsi que la protection contre certaines maladies fongiques

Les rhizobiums peuvent également entraver la croissance des champignons phytopathogènes par la production de métabolites toxiques, tels que la chitinase, la b-1,3-glucanase, les sidérophores, la solubilisation du phosphate, l'acide indole acétique, les enzymes amino cyclopropane carboxylate (ACC) désaminase et l'acide hydrocyanique (HCN). Ces métabolites jouent un rôle significant dans la rhizosphère et influencent la santé des plantes, leur croissance et les activités d'autres microbes.

RREFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Azib, 2020; La symbiose rhizobium-luzerne : étude de la diversité rhizobienne et essais d'inoculation en vue d'améliorer les rendements en fourrage dans le Sahara septentrional est-algérien.

Bardin SD, Huang HC, Pinto J, Amundsen E, De Britto Alvareg MA, Gagne S, Antoun H, Erickson RS. Biological control of Pythium damping-off of pea and sugar beet by Rhizobium leguminosarum bv. viceae. Can J Bot. 2004; 82: 291-296.

Bélanger, G., Castonguay, Y., & Lajeunesse, J. (2014). Benefits of mixing timothy with alfalfa for forage yield, nutritive value, and weed suppression in northern environments. Canadian Journal of Plant Science, 94(1), 51-60. <https://doi.org/10.4141/cjps2013-228>.

Bazzine, M., & Hamdi Aissa, B., 2014. - Etude des croûtes biologiques de quelques sols gypseux et salins du milieu saharien: cas de la cuvette de Ouargla (Sahara septentrional est algérien). Algerian journal of arid environment. 4(1), Juin 2014. 45-52.

Campillo R., R., Urquiaga C., S., Pino N., I., & Montenegro B., A. (2003). ESTIMACIÓN DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN LEGUMINOSAS FORRAJERAS MEDIANTE LA METODOLOGÍA DEL 15N. Agricultura Técnica, 63(2). <https://doi.org/10.4067/S0365-28072003000200006>

Chaabena, A., Laouar, M., Boudebbous, I., Cahouki, I., Bentebba, F., Madani, H., & Abdelguerfi, A. (2012). Behaviour of some alfalfa populations from algerian oasis. In : Acar Z. (ed.), López-Francos, A. (ed.), Porqueddu, C. (ed.). New approaches for grassland research in a context of climate and socioeconomic changes. Zaragoza : CIHEAM. Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 102, 191-196 DAVET, 1996

de Lajudie, P. M., Andrews, M., Ardley, J., Eardly, B., Jumas-Bilak, E., Kuzmanović, N., ... Young, P. (2019). Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 69(7), 1852-1863. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003426>

Elboutahiri, N., Thami-Alami, I., & Udupa, S. M. (2010). Phenotypic and genetic diversity in Sinorhizobium meliloti and S. medicae from drought and salt affected regions of Morocco. BMC Microbiology, 10(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-15>

EI

Fravel DR. Commercialization and implementation of biocontrol. *Ann Rev Phytopathol.* 2005; 43: 337-359.

Huyghe, C., Delaby, L., Rosellini, D., & Veronesi, F. (2014). Perspectives of alfalfa in Europe. *Legume Perspect.* 4: 5–6.

Javier F , Acero F, Carbu M, Garrido C, Vallejo I, Cantoral JM. Proteomic Advances in Phytopathogenic Fungi. *Curr Proteo.* 2014; 4(2): 79-88.

Lamm, F.R., Harmony, K.R., Aboukheneira, A.A., Johnson, S.K., (2012). Alfalfa production with subsurface drip irrigation in the Central Great Plains. *Trans. ASABE* 55, 1203–1212.

Laird M, Lacey LA , Davidson EW. Safety of microbial insecticides. *CRC Press* .1990; 272p.

Liu C-W., Sung y., Chen B-C., and Lai H-Y., 2014 :Effects of Nitrogen Fertilizers on the Growth and Nitrate Content of Lettuce (*Lactuca sativa* L.), 11(4): pp 4427–4440. LPWG, 2017 h

LPWG (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny – The Legume Phylogeny Working Group. *Taxon*, 66(1), 44-77. <https://doi.org/10.12705/661.3>

Martin, N.P. (2014). Perspectives of alfalfa in North America. *Legume Perspect.* pp. 7–8.

Prapagdee B, Kuekulvong C , Mongkolsuk S. Antifungal potential of extracellular metabolite produces by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *Int Biol Sci.* 2008 ; 4 : 330-337.

Quan, W., Liu, X., Wang, H., & Chan, Z. (2016). Comparative Physiological and Transcriptional Analyses of Two Contrasting Drought Tolerant Alfalfa Varieties. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01256>

Quiros, C. F., Bauchan, G. R. (1988). The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. In: Hanson, A.A., Barnes, D. K., & Hill, R. R., (eds) *Alfalfa and alfalfa improvement*. Madison, WI, USA, pp 25-91. RICHTER, 1993

SANTI C., BOGUSZ D. et FRANCHE C., 2013: Biological nitrogen fixation in non-legume plants, *Annals of Botany*, 111: pp 743–767.

Shamseldin, A., Abdelkhalek, A., & Sadowsky, M. J. (2016). Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. *Symbiosis*, 71(2), 91-109. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0462-3>

Somasegaran, P., & Hoben, H. (1985). *Methods in legume-Rhizobium technology*. University of Hawaii NifTAL Project, Paia, Hawaii.

Somasegaran, P., & Hoben, H.J. (1985). *Methods in Legume-rhizobium Technology*. NifTAL project and MIRCEN. Department of Agronomy, 2nd Soil Science Hawaii Institute Tropical Agriculture Human research, Univ Hawaii Manoa Tortora, 2003

Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994). *Handbook for Rhizobia*. Springer-Verlag New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8375-8>

UNEP. Finding Alternatives to Persistent Organic Pollutants (POPS) for termite management. Global IPM facility expert group. *Term biol manag*, Italy. 2000; 39: 118-168.

Vincent, J.M. (1970). *A manual for practical study of root nodule bacteria*. IBP Handbook 15. Blackwell Sci. Publ. Oxford.

ZERKLE A.L. et MIKHAIL S., 2017: The geobiological nitrogen cycle: From microbes to the mantle, *Geobiology*, 15: pp 343–352

Zhu, L., Zhang, H., Gao, X., Qi, Y., & Xu, X. (2016). Seasonal patterns in water uptake for *Medicago sativa* grown along an elevation gradient with shallow groundwater table in Yanchi

county of Ningxia, Northwest China. *Journal of Arid Land*, 8(6), 921-934.
<https://doi.org/10.1007/s40333-016-0017-8>

Tortora G.J., Funk B.R., Case C.L., 2003: Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. pp 826-830. Tourte Y., Bordonean M., Henry M., 2005: Le monde des végétaux organisatio, physiologie et génomique. Edition DUNOD. Paris. France.

Davet P.; 1996- Vie microbienne et protection végétale. INRA Editions (Paris) 383p.

Pelmont J., 1995. Bactérie et environnement adaptation physiologique. Ed Dunod. France.

Richter G. (1993). Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie. Edition presse polytechniques et universitaires romandes. pp. 341-352.

Kang, Y., Han, Y., Torres-Jerez, I., Wang, M., Tang, Y., Monteros, M., & Udvardi, M. (2011). System responses to long-term drought and re-watering of two contrasting alfalfa varieties. *The Plant Journal*, 68(5), 871-889. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04738.x>

Tang, L., Cai, H., Zhai, H., Luo, X., Wang, Z., Cui, L., & Bai, X. (2014). Overexpression of Glycine soja WRKY20 enhances both drought and salt tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118(1), 77-86. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0463-y>

Lepoivre P. (2003). Les bactéries phytopathogènes, In : *Phytopathology*. Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles.

Paul R. and Impens P. (2003). Les maladies non parasitaires. In : *Phytopathology*. Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles.

Semal J. and lepoivre P. (2003). Les maladies des plantes : concepts généraux. In: *Phytopathology*. Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles.

Vincelli P., Lacefield G. et Henning J. (2014). *Managing Diseases of Alfalfa*. University of Kentucky, College of Agriculture. ID-104

Qin F., Liu D., Sun B., Ruan L., Ma Z. et Wang, H. (2016). Identification of Alfalfa Leaf Diseases Using Image Recognition Technology. *PLOS ONE*, 11(12), e0168274.