

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

ECOLE NORMALE SUPÉRIEURE-KOUBA
El cheikh Mohamed El Bachir El Ibrahimy

Département de Sciences Naturelles

N° d'ordre : 165



T H È S E
Pour l'obtention du diplôme de
DOCTORAT EN SCIENCES

Filière : Biologie
Option : Microbiologie Appliquée

Présenté par
BOUKAYA Nassira

Thème

Formulation de biofongicides à base d'actinobactéries bénéfiques et application dans le biocontrôle de la pourriture racinaire du blé dur (*Triticum durum* Desf.)

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom	Grade	Institution	Statut
M ^{me} R. MERROUCHE	MCA	ENS-Kouba	Présidente
M ^r Y. GOUDJAL	MCA	Univ. de Laghouat	Directeur de thèse
M ^r A. ZITOUNI	Pr	ENS-Kouba	Co-Directeur de thèse
M ^r M. BARAKATE	Pr	F.S.S. Merrakech – Maroc	Examineur
M ^{me} M. ZAMOUM	MCA	Univ. de Laghouat	Examinatrice
M ^r O. TOUMATIA	MCA	Univ. Alger 1	Examineur
M ^r F.ATTIA	Dr	INRA/IBPT, Toulouse	Invité

Soutenance le 17 Octobre 2020 à 09h00

Résumé

En Algérie, les pourritures racinaires du blé sont des maladies redoutables causées entre autre par *Fusarium culmorum* et provoquent des pertes au niveau des champs céréaliers. Le travail présenté dans cette thèse porte sur l'étude de la capacité des actinobactéries des écosystèmes algériens à contrôler la pourriture racinaire du blé dur (*Triticum durum* Desf.) causée par *Fusarium culmorum*.

Pour cet objectif, trente isolats d'actinobactéries endophytiques et rhizosphériques ont été criblés pour leur capacité à lutter contre *F. culmorum* et à promouvoir la croissance des plantules de blé dur en comparaison avec un agent de lutte biologique (Sérénade®) et un fongicide chimique (*Dividend*®). Les résultats montrent que la bactérisation des graines de blé dur par les spores d'actinobactéries diminué significativement l'incidence de la maladie à un taux de 16 % donné par l'isolat SG1 comparativement au témoin positif (78,80%), Sérénade® (31,31%), et au *Dividend*® (24,20%). La bactérisation des graines par les spores d'actinobactéries a également amélioré la longueur des tiges et des racines, le poids frais et le poids sec des plantules de blé dur.

Les isolats performants (CA2, MB15, MB29, PT2, SG1, SN2 et ZL2) ont fait l'objet d'une étude des mécanismes impliqués dans le biocontrôle et dans l'effet *PGPB*. Les résultats montrent que la capacité des isolats d'actinobactéries à diminuer l'incidence de la pourriture racinaire et à promouvoir la croissance des plantules du blé dur est liée à leur capacité à inhiber la croissance mycélienne de *F. culmorum* et à produire des enzymes lytiques, des sidérophores, de l'acide cyanhydrique, de phytohormones, à solubiliser les phosphates et les potasses inorganiques, à libérer l'ammoniaque, à leur activité ACC-désaminase, à leur capacité à coloniser les tissus racinaires et à induire la résistance systémique chez les plantules de blé dur.

Un essai d'optimisation de la production de l'AIA par l'isolat *Streptosporangium becharense* SG1, a été réalisé selon la méthodes des surfaces de réponses. Les résultats montrent que les constituants du milieu de culture et son pH sont les facteurs déterminants de la production de l'AIA.

En se basant sur les résultats obtenus, trois isolats (*Streptosporangium becharense* SG1, *Streptomyces cyanofuscatus* SN2 et *S. caeruleatus* ZL2) ont été sélectionnés pour la formulation de leurs spores en quatre types de biofongicides. Ces derniers ont été testé pour leur efficacité de biocontrôle de *F. culmorum* Fc1 et pour leur effet *PGPB*. Les résultats montrent que le biofongicide solide en poudre de talc à base des spores de l'isolats SN2 s'est montré la meilleur formulation suivie par le biofongicide liquide à base de carboxyméthylcellulose permettant de réduire le taux d'infection des plantules de blé dur par *F. culmorum* Fc1 à travers l'induction des événements de défense liés au métabolisme oxydatif (catalase et peroxydase). Ces biofongicides ont également gardé la viabilité des spores jusqu'à 180 jours de conservation.

Considérées dans leur ensemble, les résultats de cette étude ont permis de confirmer l'intérêt des actinobactéries pour le biocontrôle de la pourriture racinaire et pour la promotion de la croissance des plantules de blé dur, et de proposer une nouvelle approche de lutte alternative pour exploiter davantage l'isolat *Streptomyces cyanofuscatus* SN2.

Mots clé : Pourriture racinaire, *Fusarium culmorum*, Blé dur, Actinobactéries, Biocontrôle, effet *PGPB*, Biofongicides.

Abstract

In Algeria, wheat root rot is a dreadful disease caused by *Fusarium culmorum* and causes losses in cereal fields. The work presented in this thesis concerns the study of the ability of actinobacteria from Algerian ecosystems to control durum wheat (*Triticum durum* Desf.) root rot caused by *Fusarium culmorum*. For this purpose, thirty endophytic and rhizospheric actinobacterial isolates were screened for their ability to control *F. culmorum* and to promote durum wheat seedling growth compared to a biological control agent (Serenade[®]) and a chemical fungicide (Dividend[®]). Seven isolates (CA2, MB15, MB29, PT2, SG1, SN2 and ZL2) selected were screened for their in vivo biocontrol capabilities and for their PGPB effect on durum wheat seedlings. Results show that the bacterisation of durum wheat seeds by actinobacterial spores significantly decreased the incidence of disease at a rate of 16% given by the isolate SG1 compared to the positive control (78.80%), Serenade (31.31%), and Dividend[®] (24.20%). Bacterisation of seeds by actinobacterial spores also improved stem and root length, fresh weight and dry weight of durum wheat seedlings.

High-performance isolates have been studied in terms of the biochemical mechanisms in the biocontrol and in the PGPB effect. The results show that the ability of actinobacterial isolates to decrease the incidence of root rot and promote the growth of durum wheat seedlings is related to their ability to inhibit mycelial growth of *F. culmorum* and to produce lytic enzymes, Siderophores, hydrocyanic acid, phytohormones, to solubilise inorganic phosphates and potash, to release ammonia, to their ACC-desaminase activity, their ability to colonize root tissues and to induce systemic resistance in durum wheat seedlings.

A test to optimize the production of IAA by the isolate *Streptosporangium becharensense* SG1 was carried out using the response surfaces method. The results show that the constituents of the culture medium and its pH are the determining factors of IAA production.

Based on the results obtained, three isolates (*Streptosporangium becharensense* SG1, *Streptomyces cyanofuscatus* SN2 and *S. caeruleatus* ZL2) were selected for the formulation of their spores into four types of biofungicides. These were tested for their biocontrol efficiency of *F. culmorum* and for their PGPB effect. The results show that the biofungicide based talc powder from SN2 spores was the best formulation followed by the carboxymethylcellulose liquid biofungicide. These biofungicides can reduce the rate of infection of durum wheat seedlings by *F. culmorum* through induction of defence events related to oxidative metabolism (catalase and peroxidase). These biofungicides also keep the spores viables for up to 180 days.

Taken together, the results of this study confirmed the interest of actinobacteria in the biocontrol of durum wheat root rot and in plant growth promotion, and propose a new alternative control approach to further exploit the *Streptomyces cyanofuscatus* SN2 isolate.

Keywords: Root rot, *Fusarium culmorum*, Durum wheat, Actinobacteria, Biocontrol, PGPB effect, Biofungicides.

مُلخَص

في الجَزَائِر، يُعَدُّ تَعَفُّنُ جُذُورِ القَمْحِ مَرَضًا خَطِيرًا يُسَبِّبُهُ فِطْرُ *Fusarium culmorum* وَيُؤَدِّي إِلَى خَسَائِرَ عَلَى مُسْتَوَى الحُقُولِ. يَتَعَلَّقُ العَمَلُ المُقَدَّمُ فِي هَذِهِ الأَطْرُوحَةِ بِدِرَاسَةِ قُدْرَةِ الأَكْتِينُوبَكْتِيرِيَا الأَنْظِمَةِ البِينِيَّةِ الجَزَائِرِيَّةِ عَلَى مُكَافَحَةِ مَرَضِ تَعَفُّنِ جُذُورِ القَمْحِ الصَّلْبِ (*Triticum durum* Desf.) وَالَّذِي يُسَبِّبُهُ *Fusarium culmorum*. مِنْ أَجْلِ هَذَا، تَمَّ اخْتِبَارُ ثَلَاثِينَ عَزْلَةً مِنْ الأَكْتِينُوبَكْتِيرِيَا الهَيْفِيَّةِ الدَّاخِلِيَّةِ وَالتِّي تَعِيشُ فِي المَنْطِقَةِ المُلاصِقَةِ للجُذُورِ لِمَعْرِفَةِ قُدْرَتِهَا عَلَى مُكَافَحَةِ *F. culmorum* وَتَحْسِينِ نُموِّ نَبَاتِ القَمْحِ الصَّلْبِ وَهَذَا مُقَارَنَةً مَعَ مُبِيدِ حَيَوِيٍّ (*Serenade*[®]) وَمُبِيدِ كِيمِيَائِيٍّ لِلْفِطْرِيَّاتِ (*Dividend*[®]).

تَمَّ اخْتِبَارُ سَبْعِ عَزَلَاتٍ (ZL2 و SN2، SG1، PT2، MB29، MB15، CA2) وَالتِّي اخْتَبِرَتْ مِنْ أَجْلِ المُكَافَحَةِ البِيُولُوجِيَّةِ وَمِنْ أَجْلِ تَأثيرِ *PGPB* عَلَى نَبَاتِ القَمْحِ الصَّلْبِ. أَوْضَحَتْ النَتَائِجُ المُتَحَصَّلَ عَلَيْهَا أَنَّ تَشْرُبَ بَدُورِ القَمْحِ الصَّلْبِ لِمُعَلِّقَاتِ أُنُوعِ الأَكْتِينُوبَكْتِيرِيَا قَلَّ بِشَكْلِ كَبِيرٍ مِنْ مُعَدَّلِ الإِصَابَةِ بِالمَرَضِ إِلَى مُسْتَوَى 16 ٪ بِالنَّسَبَةِ لِلْعَزْلَةِ SG1 مُقَارَنَةً مَعَ الشَاهِدِ الإِجَابِي (*80,78%*) ، وَ (*Serenade*[®]) (31,31%) ، وَ (*Dividend*[®]) (24,20%). مَكَّنَتْ مُعَالَجَةُ البَدُورِ بِأُنُوعِ الأَكْتِينُوبَكْتِيرِيَا أَيْضًا مِنْ تَحْسِينِ نُموِّ نَبَاتِ القَمْحِ وَذَلِكَ بِتَحْفِيزِ اسْتِطَالَةِ طُولِ السَّاقِ وَالجُذُورِ، وَكَذَلِكَ بِتَحْسِينِ وَزْنِ النَبَاتَاتِ.

خَصَعَتْ العَزَلَاتُ الفَعَالَةُ لِدِرَاسَةِ أَهَمِّ الأَلْيَاتِ المُرتَبِطَةِ بِالمُكَافَحَةِ البِيُولُوجِيَّةِ وَتَحْسِينِ نُموِّ النَبَاتَاتِ. بَيَّنَّتِ النَتَائِجُ أَنَّ قُدْرَةَ عَزَلَاتِ الأَكْتِينُوبَكْتِيرِيَا عَلَى خَفْضِ مُعَدَّلِ الإِصَابَةِ بِتَعَفُّنِ الجُذُورِ وَعَلَى تَحْسِينِ نُموِّ نَبَاتِ القَمْحِ الصَّلْبِ مُرتَبِطَةٌ بِقُدْرَتِهَا عَلَى تَنْبِيْطِ نُموِّ *F. culmorum* ، وَعَلَى إِنْتَاجِ الإِنْزِيْمَاتِ المُحَلَّلَةِ لِالجِدَارِ الخَلَوِيِّ لِلْفِطْرِيَّاتِ، مِخْلِبِيَّاتِ الحَدِيدِ (Siderophores) ، جِمَضِ السِّيَانِيْدِيْرِيكِ، هُرْمُونَاتِ النُّموِّ النَّبَاتِيَّةِ، وَعَلَى إِذَابَةِ الفُوسَفَاتِ غَيْرِ العُضْوِي وَالبُوتَاسِ، تَحْرِيرِ الأُمُونِيَاكِ، وَإِنْتَاجِ إنزِيمِ ACC-désaminase، بِقُدْرَتِهَا عَلَى اسْتِعمَارِ أَنْسِجَةِ الجُذُورِ وَعَلَى تَحْفِيزِ المُقَاوِمَةِ النَّظَامِيَّةِ لِنَبَاتِ القَمْحِ.

تَمَّ إِجْرَاءُ تَجْرِبَةٍ لِتَحْسِينِ إِنْتَاجِ هُرْمُونِ AIA بِوَاسِطَةِ العَزْلَةِ *Streptosporangium becharensis* SG1 بِاسْتِخْدَامِ طَرِيقَةِ *RSM*. أَظْهَرَتْ النَتَائِجُ أَنَّ مُكَوَّنَاتِ الوَسْطِ المُعَدِّي وَدَرَجَةَ حُمُوضِيَّتِهِ هُمَا العَامِلَانِ المُحَدِّدَانِ لِإِنْتَاجِ هُرْمُونِ AIA.

بِالاعْتِمَادِ عَلَى النَتَائِجِ المُتَحَصَّلَ عَلَيْهَا، تَمَّ اخْتِبَارُ ثَلَاثِ عَزَلَاتٍ (*Streptosporangium becharensis* SG1،

Streptomyces cyanofuscatus SN2، *S. caeruleus* ZL2) مِنْ أَجْلِ صِيَاغَةِ أُنُوعِهَا عَلَى شَكْلِ أَرْبَعِ أَنْوَاعٍ مِنَ المَبِيدَاتِ الحَيَوِيَّةِ لِلْفِطْرِيَّاتِ. تَمَّ اخْتِبَارُ هَذِهِ الأَخِيرَةِ مِنْ أَجْلِ التَّأكِدِ مِنْ فَعَالِيَّتِهَا فِي الحِمَايَةِ البِيُولُوجِيَّةِ صِدِّ *F. culmorum* وَمِنْ أَجْلِ تَأثيرِ *PGPB*. أَظْهَرَتْ النَتَائِجُ أَنَّ أَحْسَنَ مُبِيدِ حَيَوِيٍّ هُوَ المَبِيدُ الصَّلْبُ المُكَوَّنُ مِنْ مَسْحُوقِ التَّلْكَ المَمزُوجِ مَعَ أُنُوعِ العَزْلَةِ SN2، يَلِيهِ المَبِيدُ الَّذِي تَمَّتْ صِيَاغَتُهُ عَلَى شَكْلِ مُبِيدِ سَائِلٍ مُكَوَّنٍ مِنْ الكَرْبُوكْسِي مِيثِيلِ سِيلِيلُورِ. وَقَدْ مَكَّنَ كُلُّ مِنْ هَذَيْنِ المَبِيدَيْنِ مِنْ تَقْلِيلِ مُعَدَّلِ إِصَابَةِ نَبَاتِ القَمْحِ الصَّلْبِ بـ *F. culmorum* وَذَلِكَ بِتَحْفِيزِ آليَّاتِ الدَّفَاعِ المُرتَبِطَةِ بِعَمَلِيَّةِ الأَيْضِ المُؤَكْسِدِ (إِنْتَاجِ الكَاتَالِازِ وَالبِيرُوكْسِيْدَازِ). حَافَظَتْ هَذِهِ المَبِيدَاتُ الفِطْرِيَّةُ الحَيَوِيَّةُ عَلَى صِلَاحِيَّةِ الأُنُوعِ لِإِمْدَةِ تُصِلُ إِلَى 180 يَوْمًا.

إِنَّ نَتَائِجَ هَذِهِ الدِّرَاسَةِ، مُجْتَمِعَةً، تُؤَكِّدُ أَهْمِيَّةَ الأَكْتِينُوبَكْتِيرِيَا فِي المُكَافَحَةِ الحَيَوِيَّةِ لِتَعَفُّنِ الجُذُورِ وَفِي تَحْسِينِ نُموِّ نَبَاتِ القَمْحِ الصَّلْبِ، وَكَذَلِكَ بِاقْتِرَاحِ مَنَهْجِيَّةٍ جَدِيدَةٍ لِلْمُكَافَحَةِ البَدِيلِيَّةِ مِنْ أَجْلِ اسْتِغْلَالِ أَحْسَنِ العَزْلَةِ *Streptomyces cyanofuscatus* SN2.

، *PGPB* ، القَمْحِ الصَّلْبِ، الأَكْتِينُوبَكْتِيرِيَا، المُكَافَحَةُ الحَيَوِيَّةِ، تَأثيرِ *Fusarium culmorum* الكَلِمَاتِ المُفْتَاخِيَّة: تَعَفُّنِ الجُذُورِ، المَبِيدَاتِ الحَيَوِيَّةِ.