

Évaluation du potentiel antagoniste de quelques isolats de bactéries et de *Trichoderma spp.* dans le contrôle de *Zymoseptoria tritici* agent causal de la septoriose du blé

I. BARAKAT¹, N. CHTAINA¹, M. EL GUILLI², B. EZZAHIRI¹

(Reçu le 26/12/2017; Accepté le 07/01/2018)

Résumé

Le but de cette étude est de développer une méthode de lutte biologique contre la septoriose (STB) qui est l'une des principales maladies foliaires du blé au Maroc, causée par le champignon *Zymoseptoria tritici*. 120 isolats de bactéries et 70 isolats de *Trichoderma spp.* de différentes origines écologiques et géographiques, ont été testés *in vitro* pour leur potentiel antagoniste vis-à-vis de deux souches de *Zymoseptoria tritici* à savoir G1-1, dont l'une a été isolée du blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et l'autre A5-1 du blé dur (*Triticum turgidum* L. subsp., *durum* (Desf.) Husn.). Comparés aux témoins, tous les antagonistes sélectionnés suite aux tests *in vitro* (9 souches bactériennes et 18 isolats de *Trichoderma spp.*) ont montré un potentiel d'antagonisme très élevé, avec des zones d'inhibition de la croissance radiale de *Zymoseptoria tritici* allant de 34 à 84 % pour les souches bactériennes et de 40 à 70 % pour les *Trichoderma spp.*, après 96 heures de confrontation. Pour confirmer la performance des isolats sélectionnés suite aux tests *in vitro*, des tests *in vivo* sur des plants de blé en pots ont été conduits moyennant deux variétés de blé sensibles à la septoriose, à savoir 'Aguilal' (variété de blé tendre) et 'Karim' (variété de blé dur). Les pulvérisations foliaires de suspensions d'antagonistes sélectionnés se sont révélées efficaces et ont réduit significativement la sévérité de la maladie jusqu'à 91 % dans les traitements préventifs. Pour les traitements curatifs, la sévérité de la septoriose était plus importante. En effet, la réduction des symptômes varie de 7 à 72 % dans le cas des traitements à base de souches de bactéries et de 19 à 81 % pour ceux à base de *Trichoderma spp.*

Mots-clés: *Zymoseptoria tritici*, *Trichoderma spp.*, Bactéries, lutte biologique, blé.

Evaluation of antagonistic potential of some isolates of bacteria and *Trichoderma spp.* in the control of *Zymoseptoria tritici* causal agent of wheat leaf spot

Abstract

The aim of this study is to develop a bio-control method against *Zymoseptoria tritici* blotch (STB) which is a leaf disease caused by the fungus *Zymoseptoria tritici* in wheat. This disease is one of the main diseases of wheat in Morocco. 120 isolates of bacteria and 70 isolates of *Trichoderma spp.* of various ecological and geographical origins, were tested *in vitro* for their antagonistic potential towards two strains of *Zymoseptoria tritici*, namely G1-1 which was isolated from soft wheat (*Triticum aestivum* L.) and A5-1 which was isolated from durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum* (Desf.) Husn.). Compared to the controls, all the antagonists selected after the *in vitro* tests (9 bacterial strains and 18 *Trichoderma spp.* isolates) showed a very high antagonism potential, generating zones of inhibition of the radial growth of *Zymoseptoria tritici*, which ranged from 34 to 84 % for the bacterial strains and from 40 to 70 % for the *Trichoderma spp.*, after 96 hours of confrontation. To confirm the performance of the selected isolates *in vitro*, an *in vivo* assay on inoculated potted plants by the pathogen was conducted using two sensitive wheat varieties to septoria disease; 'Aguilal' (soft wheat variety) and 'Karim' (durum wheat variety). Spraying of selected antagonists suspensions onto leaf surfaces of wheat plants proved to be effective and significantly reduced the severity of the septoria disease up to 91 % in the preventive treatments. For curative treatments, the intensity of disease was more important. The symptoms were reduced from 7 to 72 % in the case of bacterial treatments and from 19 to 81 % for *Trichoderma spp.* strains.

Keywords: *Zymoseptoria tritici*, *Trichoderma spp.*, Bacteria, biological control, wheat.

INTRODUCTION

La septoriose causée par *Zymoseptoria tritici* (téléomorphe: *Mycosphaerella graminicola*), est l'une des principales maladies foliaires du blé au Maroc, surtout en années pluvieuses (Ezzahiri, 2001).

Pour faire face à cette maladie, la lutte chimique reste la plus prépondérante avec tous les effets négatifs qu'elle peut avoir sur l'environnement et la santé de l'homme (Lorgue *et al.*, 2002), l'utilisation des antagonistes comme moyen de lutte biologique demeure une méthode alternative à la lutte chimique. Ces micro-organismes peuvent agir

directement et indirectement sur l'agent pathogène, par différents mécanismes d'action, notamment le mycoparasitisme, l'antibiose, l'induction de la résistance de la plante et la compétition pour les nutriments et l'espace (Dennis et Webster, 1971; Windham *et al.*, 1985; Ghisalberti et Sivasithamparam, 1991; Harman, 2000, 2005; Perello *et al.*, 2002; Howell, 2003; Woo *et al.*, 2005; Verma *et al.*, 2007; Kildea *et al.*, 2008; Lynch, 2016).

Le potentiel antagoniste de plusieurs micro-organismes sur les maladies foliaires des céréales a été rapporté par plusieurs chercheurs. Citons comme exemple le cas de *Pseudomonas fluorescens* (Levy *et al.*, 1988, 1989), de

¹ Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II - Département de Production, Protection et Biotechnologie Végétales, barakat.iavcha@gmail.com

² Institut National de la Recherche Agronomique Maroc

Pseudomonas putida (Flaishman et al., 1996), *Paecilomyces lilacinus* (Perello et al., 2002) et *Trichoderma spp.* (Perello et al., 2006, 2009).

Dans ce contexte, on s'est proposé d'étudier le potentiel antagoniste de certains micro-organismes isolés à partir du sol ou de plantes sur le patho-système blé-septoriose au Maroc.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Origines des isolats de septoriose

La collecte des échantillons de feuilles de blé présentant des symptômes de la septoriose a été effectuée au niveau de quatre régions du Maroc: Doukkala, Abda, Gharb et Chaouia (Tableau 1) lors de la campagne 2015-2016.

Isolement de *Zymoseptoria tritici*

L'isolement s'est fait à partir des feuilles de blé portant des lésions à pycnides. Après désinfection, les feuilles ont été mises en chambre humide dans des boîtes de pétri. Les boîtes ont été incubées à une température de 18°C pour une durée de 24 heures. Le cirrhe libéré par les pycnides a été transféré sur milieu PDA (Potato-Dextrose-Agar) à l'aide d'une aiguille montée sous loupe binoculaire. Après 4 jours d'incubation à 18°C, on sélectionne les colonies de *Zymoseptoria tritici* pour les repiquer sur PDA à raison d'une colonie par boîte. Après trois semaines d'incubation, les souches ont été conservées à 4°C. Les références des isolats obtenus sont indiquées dans le tableau 1.

Tableau 1: Références et origines des isolats de *Zymoseptoria tritici* isolés en 2015-2016

Région d'origine	Référence des isolats	Culture
Gharb	G1-1 → G1-12	Blé tendre
	G2-1 → G2-37	
Doukkala	A1-1 → A1-19	Blé tendre
Abda	A5-1 → A5-10	Blé dur
Chaouia	S1-1 → S1-4	Blé tendre

Isolement des micro-organismes antagonistes à partir du sol

Suite à des prospections sur le terrain, des échantillons du sol de la rhizosphère de différentes cultures (blé, vigne, oignon) ont été prélevés (Tableaux 2 et 3). Au laboratoire, ces échantillons ont été séchés et broyés. Dix grammes du sol sec de chaque échantillon ont été mélangés avec 90 ml d'eau distillée stérile contenue dans un erlynmeyer. Ensuite, cette suspension a été agitée pendant 30 min pour obtenir une bonne dilacération des particules. Afin d'obtenir des concentrations variables de micro-organismes et de faciliter le criblage des colonies, une série de dilutions a été réalisée à partir de la solution mère allant de 10⁻² jusqu'à 10⁻⁷. Trois prélèvements de 0,1 ml de chaque dilution ont été étalés dans des boîtes de pétri contenant le milieu de culture Caseine-Soja amendé avec le cyclohexamide pour l'isolement des bactéries et le milieu de PDA acidifié pour l'isolement des champignons. Les boîtes ensemencées ont été incubées à 25 °C en obscurité. Après 24 heures, on procède à la purification des colonies présentant des différences de couleur et de texture, par repiquages. Les souches purifiées ont été conservées à 4 °C.

Tableau 2: Références et origines des isolats de bactéries isolés à partir du sol

Isolat	Culture	Région d'origine
I18, I22, I40, I61, I62, I63, I64, I65, I66, I67, I68, I69, I70, I71, I72, I73, I74, I75, I76, I77, I78, I79, I80	Vigne	Abda
I105, I106, I107, I108, I109, I110	Blé tendre	Gharb
I30, I33, I34, I41, I42, I48, I49, I50, I51, I52, I53, I54, I55, I56, I57, I58, I59, I60	Vigne	Zaer
I25, I2, I1, I26, I19, I17, I14, I15, I8	Oignon	Chaouia
I91, I92, I93, I94, I95, I96, I97, I99, I101, I102, I104	Orge	Doukkala
I111, I112, I100, I98	<i>Nerium oleander</i>	Tadla

Tableau 3: Références et origines des isolats de *Trichoderma spp.* isolés à partir du sol

Isolat	Culture	Région d'origine
E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, F1, F2, F3	Fraisier	Gharb
A, B, C, D	Arganier	Souss
T1-1, T1-2, T1-3, T1-4	Olivier	Tadla
T3-1, T3-2, T3-3, T3-4, T3-5, T3-6, T3-7	Amandier	Tadla
T5-1, T5-2, T5-3, T5-4, T5-5, T5-6, T5-7, T5-8, T5-9, T5-10, T5-11, T5-12, T5-13, T5-14, T5-15, T5-16, T5-17	<i>Nerium oleander</i>	Tadla
T6-1, T6-2, T6-3	Euphorbe	Tadla
T7-1, T7-2, T7-3, T7-4	Orge	Tadla
TC1, TC2, TC3, TC4	Carotte	Doukkala

Isolement des antagonistes à partir du végétal

Des échantillons de différentes parties des plants de blé et d'orge (feuilles, épis, tiges) ont été utilisés pour l'isolement des antagonistes (Tableaux 4 et 5).

Concernant les bactéries, un mélange de 10 g du végétal et 90 ml d'eau physiologique (eau distillée avec 8,5 g de NaCl stérilisée), a été mis en agitation pendant une heure. Une série de dilution de la solution mère jusqu'à 10⁻⁶ a été réalisée. Un volume de 0,1 ml de chaque dilution a été étalé sur le milieu PDA. Les boîtes ensemencées ont été incubées à 25°C en obscurité. Après 24 h, les colonies qui présentent des différences morphologiques ont été sélectionnées et purifiées avant leur conservation.

Quant aux champignons, après la désinfection des fragments du végétal, ces derniers ont été placés dans des boîtes de pétri avec de l'eau gélosée ou bien du milieu PDA. Les boîtes ont été incubées à 25°C en obscurité pendant sept jours. Le mycélium développé a été repiqué et purifié par des repiquages successifs ou bien par culture monospore.

Tableau 4: Références et origines des isolats de bactéries isolés à partir du végétal

Isolat	Culture	Région d'origine
I29, I32, I35, I36, I37, I38, I39, I81, I82, I83, I84, I85, I86, I87, I88, I89, I90, I103	Partie aérienne du blé dur	Abda
I21, I23, I43, I31, I44, I45, I46, I47	Partie aérienne d'orge	Doukkala-Abda
I3, I4, I5, I6, I7, I9, I10, I11, I12, I13, I16, I20, I24, I27, I28	Partie aérienne du blé tendre	Gharb
H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8		Meknès

Tableau 5: références et origines des isolats de *Trichoderma spp.* isolés à partir du végétal

Isolat	Culture	Région d'origine
TB1, TB2, TB3, TB4	Feuilles de betterave	Doukkala
TO1, TO2, TO3, TO4	Branche d'olivier	Chaouia
A1, A2, A3	Feuilles de blé tendre	Gharb
TM1, TM2	Graines de maïs	Gharb
A5, A4	Feuilles de blé dur	Abda

Évaluation de l'activité protectrice des antagonistes isolées vis à vis de *Zymoseptoria tritici* in vitro

Isolats de l'agent pathogène

Parmi les isolats de *Zymoseptoria tritici* isolés et purifiés, deux ont été choisis pour les essais in vitro. Il s'agit de l'isolat A5-1, originaire de Doukkala-Abda et isolé à partir du blé dur et l'isolat G1-1, originaire du Gharb et isolé à partir du blé tendre.

Milieu de confrontation direct agent pathogène -antagoniste

Les essais de confrontation des isolats A5-1 et G1-1 de *Zymoseptoria tritici*, avec les différentes souches d'antagonistes (bactéries et *Trichoderma spp.*) ont été réalisés sur le milieu PDA qui permet la croissance aussi bien de l'agent pathogène que des antagonistes.

Étude de l'effet antagoniste sur la croissance de *Zymoseptoria tritici*

Un volume de 0,5 millilitres de la suspension de pycnidiospores de *Zymoseptoria tritici* avec une concentration de 10^6 pycnidiospores/ml a été étalé sur milieu PDA contenu dans des boîtes de pétri. Les boîtes ont été incubées à 25 °C en obscurité. Après 24 h, 10 µl de la suspension des antagonistes (bactéries et *Trichoderma spp.*) a été déposée au centre des boîtes de pétri. Ces dernières ont été ré-incubées dans les mêmes conditions. Cette expérimentation a été répétée 4 fois pour chaque isolat avec trois répétitions dans chaque expérience.

Évaluation de l'antagonisme

Le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance de *Zymoseptoria tritici* a été mesuré après 72 h et 96 h de confrontation (Figure 1).

Analyse statistique

Dans cette expérimentation, le facteur étudié est le diamètre d'inhibition de la zone de croissance de *Zymoseptoria tritici* en présence de chacun des antagonistes sélectionnés. Les données sont analysés par une analyse de la variance à un seul facteur de variation. La comparaison des moyennes des différentes souches a été effectuée par le test de Duncan.

Étude de la sensibilité variétale

Matériel végétal

Douze variétés de blé tendre et quatre variétés de blé dur (Tableau 6) communément utilisées par les céréaliers ont été choisies. L'objectif de cette étude est d'évaluer leur degré de sensibilité vis-à-vis des souches de *Zymoseptoria tritici* provenant de différentes régions du Maroc. Ces variétés sont toutes inscrites au catalogue officiel national, sauf la variété Fertas qui est un génotype provenant des oasis.

Le semis a été réalisé dans des pots de 9,5 x 10,5 cm à raison de 5 graines par pot et 5 répétitions pour chaque variété et chaque stade végétatif, dans un substrat constitué de 1/3 de tourbe et 2/3 du sol stérilisé. Les pots sont placés sous serre jusqu'à ce que les plants atteignent les stades 23 et 58 selon l'échelle de Zadoks (Zadoks et al., 1974).

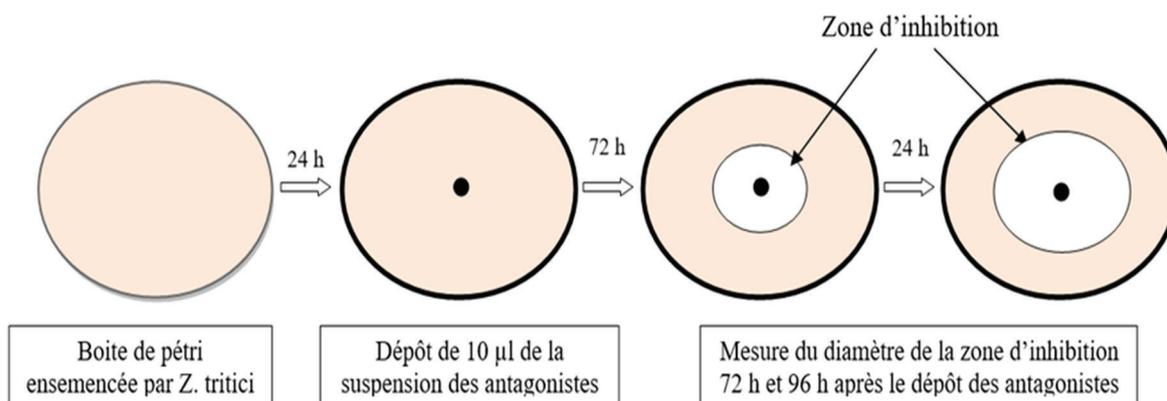


Figure 1: Protocole de confrontation entre *Z. tritici* et les antagonistes in vitro

Tableau 6: Variétés retenues pour l'essai de sensibilité variétale avec leurs origines

Blé tendre	Blé dur	Origine
Virgile Kanz Aguilal Wafia Kharouba Achtar	Marjana Carioca Marzak Karim	INRA-Station El Manzeh-Kénitra
Radia Amal Arrehane Salama Bandera		ONSSA-Station El Guich
Fertas		Laboratoire de phytopathologie - IAV Hassan II - Rabat

Production de l'inoculum de *Zymoseptoria tritici* et inoculation des plants

Deux souches de *Zymoseptoria tritici* ont été utilisées pour la production de l'inoculum. Il s'agit des souches G1-1 et A5-1. Les cultures purifiées des deux souches ont été conservées à 4°C sur milieu PDA. Avant leur utilisation, elles ont été repiquées deux fois sur PDA et incubées à 18 °C à l'obscurité pendant 7 jours pour une production massive de spores. La masse muqueuse développée à la surface des cultures a été grattée avec 3 ml d'eau distillée stérile et mise dans un milieu liquide YMS (4 g de saccharose, 4 g d'extrait de levure et 4 g d'extrait de malt pour un litre d'eau distillée) qui favorise la multiplication des pycnidiospores. Ce milieu a été retenu suite à une comparaison entre plusieurs milieux de culture. Dans ce milieu, les pycnidiospores du pathogène ont été maintenus en agitation rapide pendant 7 jours à 18°C en obscurité. La suspension résultante a été centrifugée pendant 5 min à 5000 tours/min. Le culot a été lavé 3 fois avec l'eau distillée stérile et dilué afin d'ajuster la concentration à 10⁶ pycnidiospores/ml à l'aide de la cellule de mallassez. La suspension de pycnidiospores a été amendée par 0,02% de tween 20.

Inoculation des plants

L'inoculation a été réalisée par pulvérisation foliaire de la suspension de pycnidiospores de chacune des souches choisies. Les plants ont été inoculés jusqu'au point d'égouttement. Les plants inoculés par chaque souche ont été placés sous des conditions contrôlées dans une chambre munie d'un système de brumisation et un éclairage à photopériode 12 h/12 h pendant 48 h, puis ils ont été placés séparément sous serre avec une humidité relative de 95 %.

Évaluation de la maladie

Trois semaines après inoculation, on évalue l'importance des lésions qui présentent des pycnides au niveau des feuilles de deux plants choisis au hasard, moyennant la clé de Ziv et Eyal (Eyal et al., 1987).

Analyse statistique

Les données du pourcentage de la sévérité ont été transformées en arcsin de la racine carrée avant l'analyse de la variance par le logiciel SPSS. Les facteurs étudiés sont les variétés, les stades végétatifs et les souches de *Zymoseptoria tritici*. La comparaison des moyennes de la sévérité des différentes variétés a été réalisée par le test de Duncan.

Évaluation *in vivo* de l'activité protectrice des antagonistes vis-à-vis de *Zymoseptoria tritici***Variétés de blé et préparation des plantes**

Selon les essais de l'étude de la sensibilité variétale, deux variétés sensibles à la septoriose ont été choisies (Aguilal de blé tendre et Karim de blé dur) pour tester l'effet antagoniste des isolats de bactéries et de *Trichoderma spp.* sélectionnés *in vitro*.

Le semis a été réalisé dans des pots de 9,5 x 10,5 cm à raison de 5 grains par pot et 5 répétitions pour chaque mode de traitement. Le substrat utilisé était constitué de 1/3 de la tourbe et 2/3 du sol stérilisé. Les pots sont placés sous serre jusqu'à ce que les plantes atteignent le stade 14 ZSG (Zadoks et al., 1974).

Production de l'inoculum de la septoriose

L'inoculum de *Zymoseptoria tritici* a été préparé par le même protocole décrit dans la partie de l'étude de la sensibilité variétale.

Production de l'inoculum de *Trichoderma spp.*

L'inoculum des isolats de *Trichoderma spp.* a été obtenu par grattage de la surface des cultures mycéliennes des différentes souches qui ont été développées sur milieu PDA et incubées 15 jours à 25°C avec une photopériode de 12h/12h. La suspension récupérée a été filtrée et la concentration a été déterminée à l'aide d'une cellule de malassez afin de pouvoir ajuster la concentration à 10⁸ spores/ml.

Afin de maintenir les antagonistes et d'optimiser leur activité sur les plants, on a utilisé un milieu nutritif au lieu de l'eau distillée. Ce milieu est composé de 0,01 M de saccharose pour un litre d'eau distillée. L'inoculum a été amendé par 0,02 % du tween 20 pour une meilleure adhérence de l'inoculum à la surface des feuilles.

Production de l'inoculum des bactéries

Les souches des bactéries ont été ensemencées sur PDA et incubées à 25°C en obscurité. Après 72 h, la surface des boîtes a été grattée avec 3 ml du bouillant de Luria-Bertani (LB) (Luria et Burrous, 1957) qui est un milieu très riche en substances nutritives. Ce milieu a été utilisé aussi pour la préparation des suspensions, ce qui favorise la viabilité des bactéries sur les plantes. La suspension de chaque souche a été filtrée avec trois couches de pansement stérile; puis la concentration du filtrat obtenu a été déterminée et ajustée à 10⁸ cfu/ml. De même, 0,02 % du tween 20 a été ajoutée à l'inoculum pour assurer la fixation de l'inoculum sur les feuilles.

Modes de traitement des plants avec les antagonistes

Deux modes de traitement avec les antagonistes ont été adoptés afin de déterminer le mode le plus adapté à l'utilisation des antagonistes comme moyen de lutte contre la septoriose. Pour ce faire, neuf plants (trois plantes par pot)

de chaque variété ont été utilisés pour chaque traitement.

- Traitement préventif

Le traitement des plantes par les antagonistes a précédé l'inoculation par *Zymoseptoria tritici* de 48 h.

- Traitement curatif

Le traitement des plantes par les antagonistes a été effectuée 48 h après leur inoculation avec *Zymoseptoria tritici*.

- Préparation de lot de plants témoins

Pour chaque mode de traitement, un témoin a été réalisé. Ce dernier, a été inoculé par *Zymoseptoria tritici* et le milieu de culture seul amendé par le tween 20 sans antagonistes.

Inoculation des plantes

Les plants ont été inoculés de manière uniforme jusqu'au point d'égouttement par la suspension de pycnidiospores de *Zymoseptoria tritici* ou celles des antagonistes. Une barrière plastique a été utilisée pour la séparation entre les différents lots inoculés afin d'éviter le risque de mélange des isolats.

Les plants inoculés ont été placés sous conditions contrôlées dans une chambre munie d'un système de brumisation continue et un éclairage à photopériode 12 h/12 h pendant 48 h à une température de $17^{\circ}\text{C} \pm 1$, puis ils ont été ré-inoculés par les suspensions des isolats des antagonistes ou bien celle de *Zymoseptoria tritici*. Les témoins sont ré-inoculés par les milieux nutritifs avec 0,02 % du tween 20. Les pots sont replacés dans la chambre à condition contrôlées pendant 48 h puis ils ont été placés séparément sous serre (tunnel plastique) avec une humidité relative de 95 %.

Évaluation de la réponse à l'infection

L'évaluation de la sévérité de la maladie s'effectue de la même manière que dans la partie de l'étude de la sensibilité variétale.

Ré-isolement des antagonistes

Afin de s'assurer que les antagonistes sont encore viables sur les plants inoculés, un ré-isolement a été effectué 30 jours après l'inoculation. Pour se faire, 2,5 g de feuilles des plants de chaque souche et chaque mode de traitement ont été pesées, coupées et agitées pendant une heure dans 50 ml d'eau distillée stérile pour les champignons et de l'eau physiologique stérile pour les bactéries. Les suspensions obtenues ont été diluées jusqu'à 100 fois, puis 0,1 ml de chaque dilution a été étalé sur milieu PDA avec trois répétitions.

Analyse statistique

Les données exprimées en pourcentage de sévérité ont été transformées en arcsin de la racine carrée avant l'analyse de la variance par le logiciel SPSS. Les facteurs étudiés sont: les traitements (chaque isolat des antagoniste correspond à un traitement) et le mode de traitement (préventif et curatif). La comparaison des moyennes des traitements de chaque mode de traitement a été réalisée par le test de Duncan.

RÉSULTATS

Efficacité des antagonistes pour le contrôle de *Zymoseptoria tritici* in vitro

Parmi les 120 isolats de bactéries et 70 isolats de *Trichoderma spp.* testés, 9 souches de bactéries et 18 souches de champignons ont montré des capacités de contrôle de la septoriose (Figures 4 et 5). Cette efficacité a été observée sur les diamètres des zones d'inhibition de la croissance de *Zymoseptoria tritici* sur le milieu PDA. Les photos 1 et 2 montrent le résultat de confrontation d'une bactérie et d'une souche de *Trichoderma harzianum* avec l'isolat G1-1 de *Z. tritici*.

La comparaison des moyennes des diamètres des zones d'inhibition engendrées par les bactéries antagonistes a donné lieu à quatre groupes avec des moyennes des diamètres des zones d'inhibition allant de 3,6 à 6,3 cm après 96 h (Figure 4). Quant aux *Trichoderma spp.*, on a eu neuf groupes avec des moyennes des diamètres des zones d'inhibition variant de 3,1 cm à 7,6 cm après 96 h de confrontation (Figure 5).

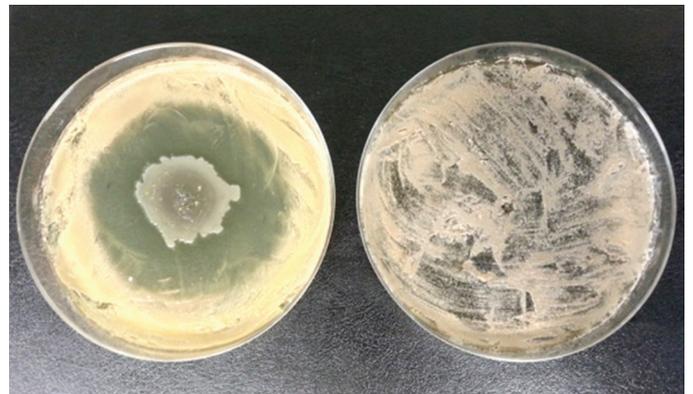


Figure 2: Confrontation entre la bactérie I18 et l'isolat G1-1 de *Zymoseptoria tritici* (boîte à gauche) après 96 d'incubation; la boîte à droite représente le témoin

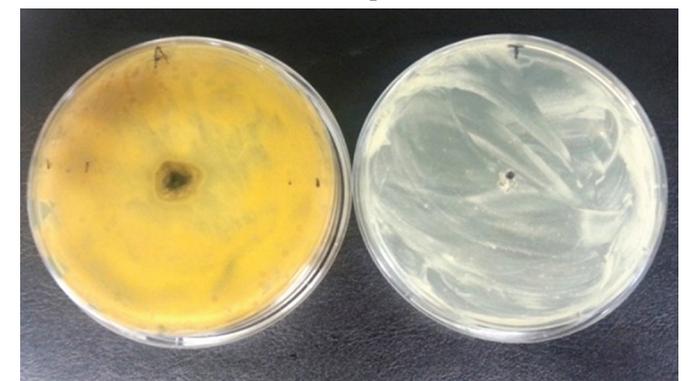


Figure 3: Confrontation entre *Trichoderma harzianum* et l'isolat G1-1 de *Zymoseptoria tritici* (boîte à gauche) après 96 h d'incubation; la boîte à droite représente le témoin

Étude de la sensibilité de quelques variétés marocaines à la septoriose

D'après les résultats d'inoculation par la souche G1-1, il ressort que toutes les variétés du blé tendre testées ont présentées le symptôme typique de la maladie 'lésions avec pycnides', alors qu'aucune variété de blé dur n'a pas montrée de pycnides. Il apparaît aussi qu'il y a une différence significative de la sévérité de la maladie entre les douze variétés.

L'analyse de la variance a fait ressortir des variétés très sensibles comme Aguilal et Fertas dont la moyenne de l'arcsin de la racine carrée est de 1,2 soit 84 %. D'autres variétés sont moins sensibles tel que Salama, Kanz, Kharruba, Amal et Bandira avec une moyenne de 1 soit 70 % et 0,9 pour Radia qui correspond à 63,7 %. Les moyennes des autres variétés varient entre 0,8 et 0,6 (Figure 6).

Les résultats de l'inoculation par la souche A5-1 indiquent aussi que toutes les variétés de blé dur et blé tendre ont présentées les symptômes de la septoriose.

L'analyse de ces résultats a démontré une différence significative entre les différentes variétés. La comparaison des valeurs du recouvrement pycnidien a classé les variétés en six groupes, dont le plus sensible est représenté par Aguilal et Fertas avec une moyenne de 1,2 soit 84 % (Figure 7).

Concernant la comparaison des deux stades végétatifs testés, l'analyse de la variance a montré qu'il n'y a pas de différence significative entre eux.

Contrôle des souches G1-1 et A5-1 de *Zymoseptoria tritici* par les antagonistes *in vivo* (sous serre)

Traitement préventif

Les résultats obtenus nous ont permis de déduire que tous les isolats des antagonistes ont montré une bonne protection des variétés 'Karim' et 'Aguilal' vis-à-vis de *Zymoseptoria tritici*.

Concernant les souches bactériennes, les valeurs de sévérité sont plus élevées sur Aguilal (Figure 8) par rapport à Karim (Figure 9), mais les isolats les plus performants appartient toujours aux mêmes groupes qui présentent les valeurs de sévérité les plus basses, à savoir I18, I3 et I35 dont les moyennes de l'arcsin de la racine carrée sont respectivement 0,28; 0,29 et 0,31 soit 87 % sur la variété Aguilal et 0,26; 0,33; 0,33 qui correspond respectivement à 91 et 83 % sur la variété Karim.

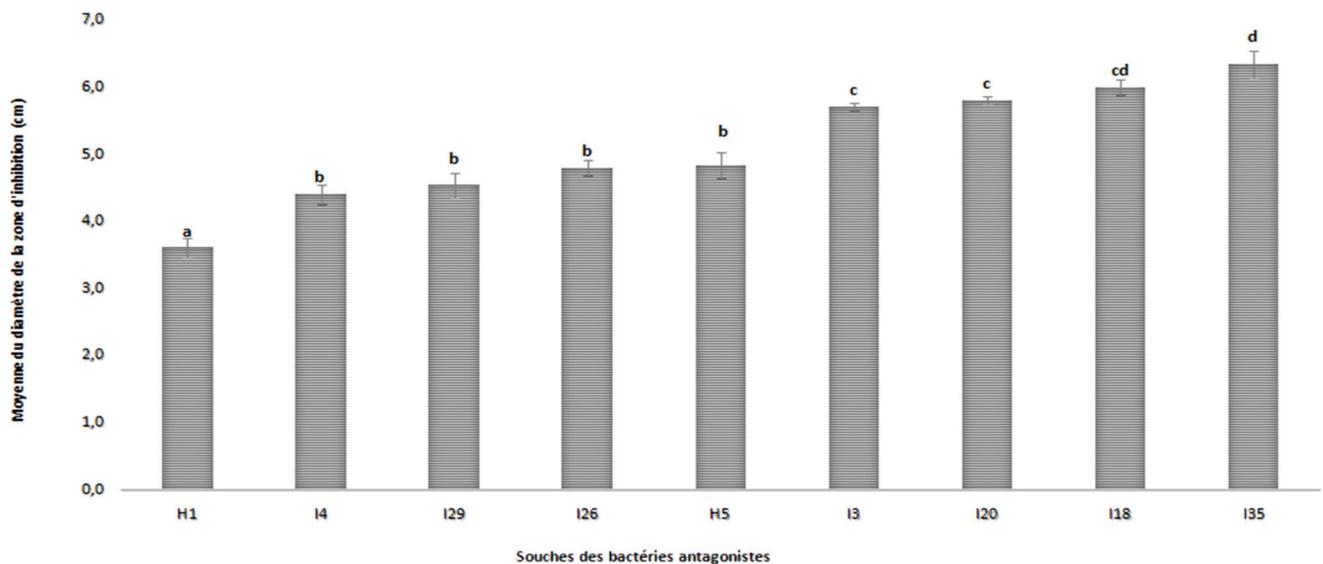


Figure 4: Potentiel antagoniste des isolats de bactéries vis-à-vis de *Zymoseptoria tritici* *in vitro* après 96 h d'incubation. Les barres indiquent les écarts types des moyennes (Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas significativement différentes avec le test de Duncan à $p=0,05$)

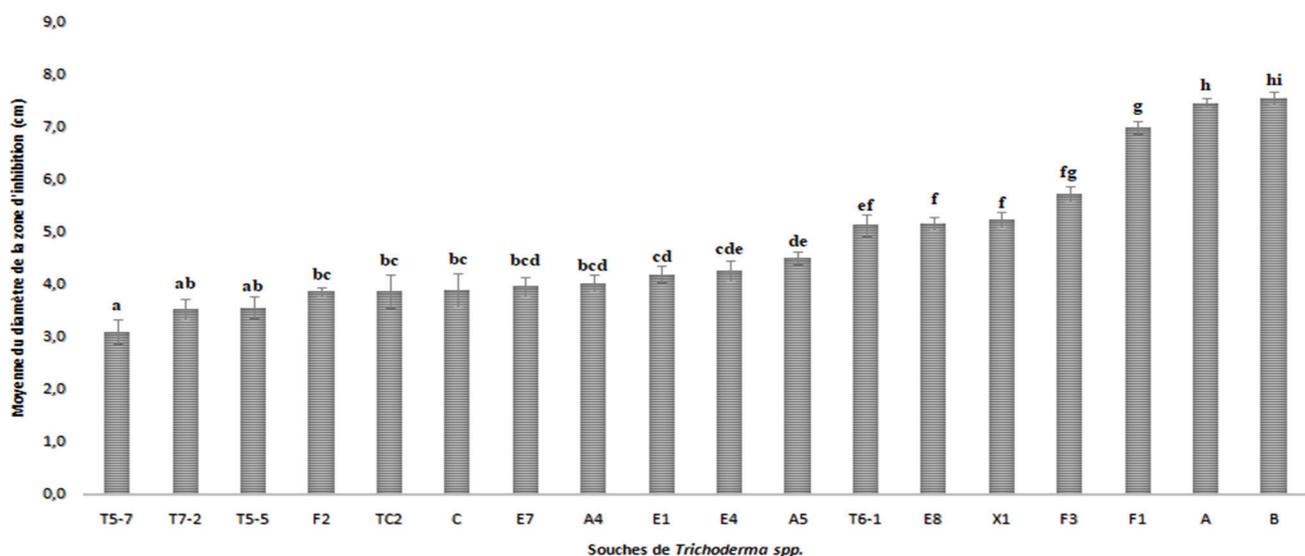


Figure 5: Potentiel antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de *Zymoseptoria tritici* *in vitro* après 96 h d'incubation. Les barres indiquent les écarts types des moyennes (Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas significativement différentes avec le test de Duncan à $p=0,05$)

Quant aux souches de *Trichoderma spp.*, l'ensemble des isolats peut être utilisé comme moyen de lutte contre la septoriose. Toutefois, l'analyse de la variance a révélée une différence significative entre les moyennes des isolats des antagonistes. Les isolats les plus performants sont ceux des deux premiers groupes, il s'agit des isolats A, A5 et B qui ont respectivement réduit les symptômes de 0,24; 0,24 et 0,30 soit 91 et 88 % par rapport au témoin sur Aguilal (Figure 10) et de 0,28; 0,31 et 0,35 soit 91 et 84 % sur Karim (Figure 11).

D'après ces résultats, on peut conclure qu'il n'y a pas eu de différence significative entre les niveaux de protection des isolats de bactéries I18, I3 et I35 et des isolats A, A5 et B de *Trichoderma spp.*

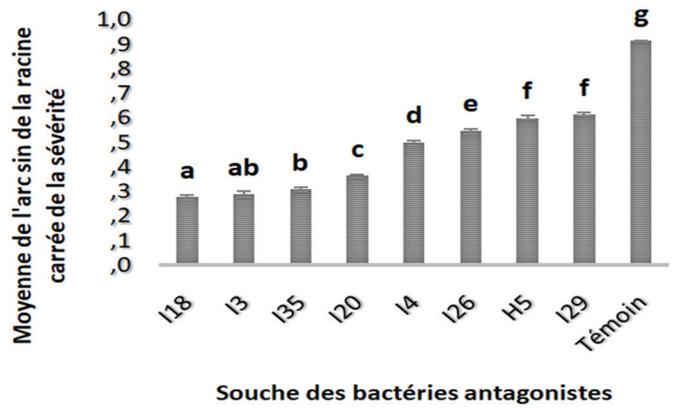


Figure 8: Potentiel antagoniste des isolats de bactéries vis-à-vis de la souche G1-1 de *Z. tritici* in vivo sur la variété Aguilal en traitement préventif (Les barres indiquent les écarts types des moyennes. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas significativement différentes avec le test de Duncan à $p=0,05$)

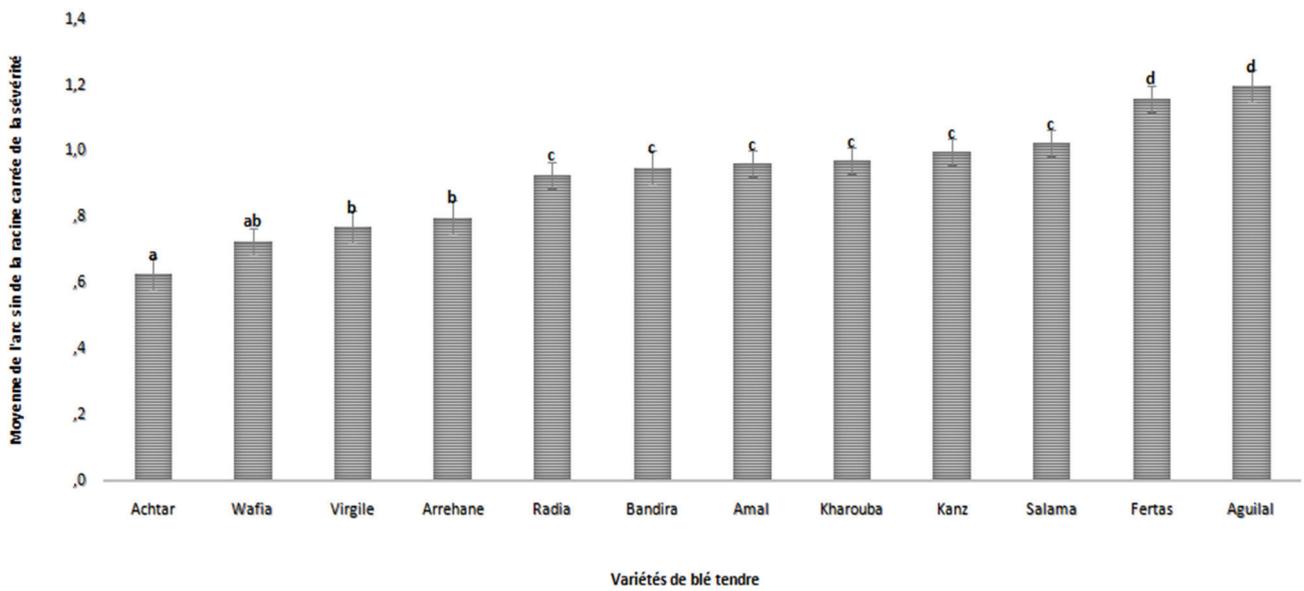


Figure 6: Comportement de douze variétés de blé tendre vis-à-vis de l'isolat G1-1 de *Z. tritici* originaire du blé tendre de la région du Gharb. Les barres indiquent les écarts types des moyennes (Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas significativement différentes avec le test de Duncan à $p=0,05$)

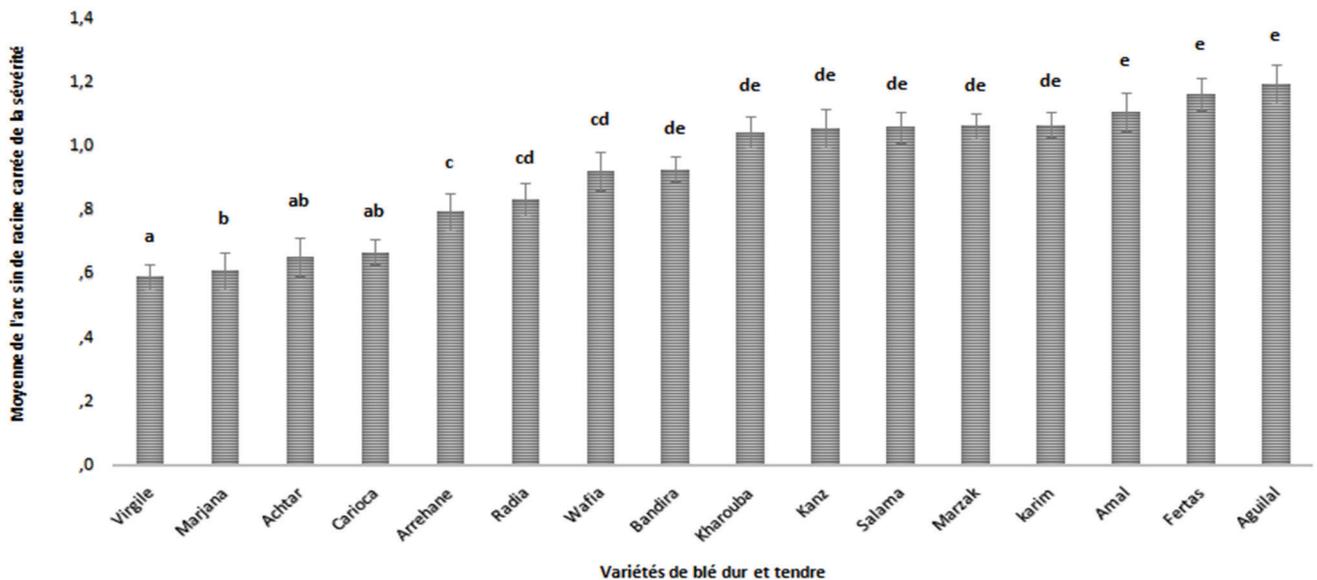


Figure 7: Comportement de douze variétés de blé tendre et quatre de blé dur vis-à-vis de l'isolat A5-1 de *Z. tritici* originaire du blé dur de la région de Doukkala-Abda (Les barres indiquent les écarts types des moyennes. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas significativement différentes avec le test de Duncan à $p=0,05$)

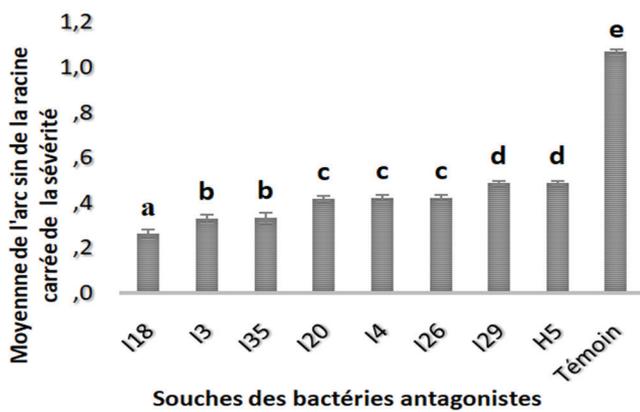


Figure 9: Potentiel antagoniste des isolats de bactéries vis-à-vis de la souche A5-1 de *Z. tritici* in vivo sur la variété Karim en traitement préventif (Les barres indiquent les écarts types des moyennes. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas significativement différentes avec le test de Duncan à $p=0,05$)

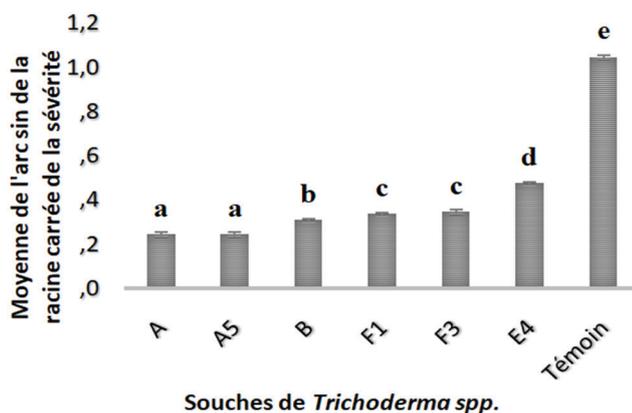


Figure 10: Potentiel antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de la souche G1-1 de *Z. tritici* in vivo sur la variété Aguilal en traitement préventif (Les barres indiquent les écarts types des moyennes. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas significativement différentes avec le test de Duncan à $p=0,05$)

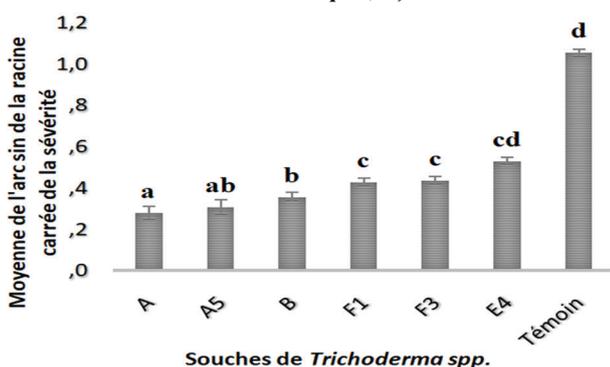


Figure 11: Potentiel antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de la souche A5-1 de *Z. tritici* in vivo sur la variété Karim en traitement préventif (Les barres indiquent les écarts types des moyennes. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas significativement différentes avec le test de Duncan à $p=0,05$)

Traitement curatif

L'analyse des résultats de la sévérité des isolats G1-1 et A5-1 de *Zymoseptoria tritici* a montré que l'intensité de la maladie est plus importante dans le cas du traitement curatif par rapport au préventif. Les moyennes de l'arcsin de la racine carrée de la sévérité varient de 0,46 à 0,90 sur Aguilal (Figure 12) et de 0,56 à 1,10 sur Karim (Figure 13) dans le cas de traitement avec les souches bactériennes, ce qui correspond à une réduction de 72 à 7 % sur Aguilal et de 64 à 5 % sur Karim.

Pour les isolats de *Trichoderma* spp., les moyennes varient de 0,36 à 0,84 ce qui donne une réduction de 81 à 19 % sur Aguilal (Figure 14). Pour la variété Karim, les moyennes varient de 0,71 à 0,91 et les pourcentages de réduction de la sévérité ne dépassent pas 43 % par rapport au témoin (Figure 15).

Ces valeurs montrent que l'installation de l'agent pathogène avant le traitement favorise l'apparition des symptômes. Cependant, la comparaison de ces valeurs avec celles des témoins, démontre que malgré le retard du traitement avec les antagonistes, leur efficacité reste importante, surtout pour les souches I18, I3, I35, A et A5.

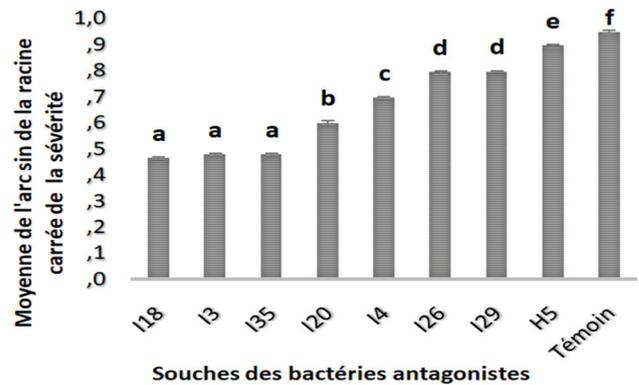


Figure 12: Potentiel antagoniste des isolats de bactéries vis-à-vis de la souche G1-1 de *Z. tritici* in vivo sur la variété Aguilal en traitement curatif (Les barres indiquent les écarts types des moyennes. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas significativement différentes avec le test de Duncan à $p=0,05$)

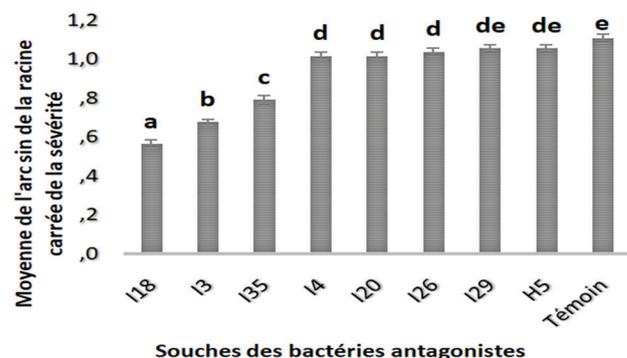


Figure 13: Potentiel antagoniste des isolats de bactéries vis-à-vis de la souche A5-1 de *Z. tritici* in vivo sur la variété Karim en traitement curatif (Les barres indiquent les écarts types des moyennes. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas significativement différentes avec le test de Duncan à $p=0,05$)

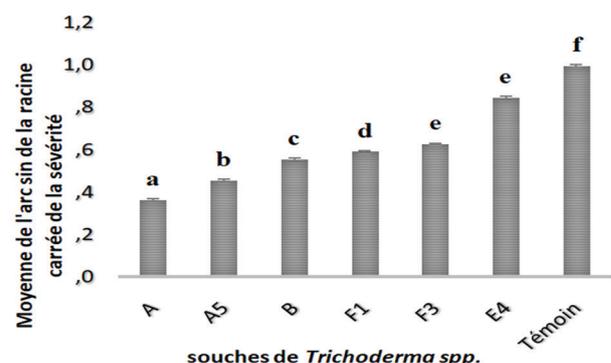


Figure 14: Potentiel antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de la souche G1-1 de *Z. tritici* in vivo sur la variété Aguilal en traitement curatif (Les barres indiquent les écarts types des moyennes. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas significativement différentes avec le test de Duncan à $p=0,05$)

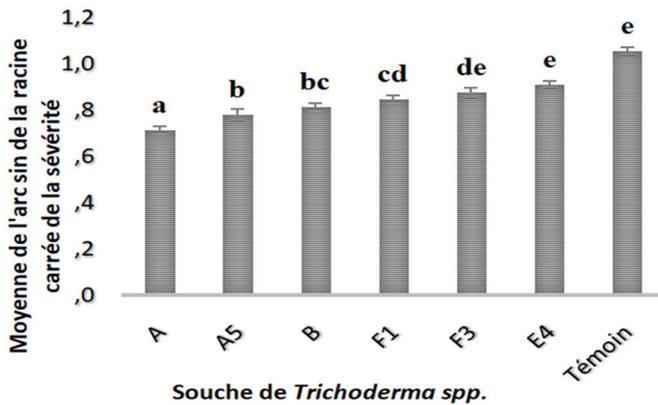


Figure 15: Potentiel antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de la souche A5-1 de *Z. tritici* in vivo sur la variété Karim en traitement curatif (Les barres indiquent les écarts types des moyennes. Les moyennes taguées avec une lettre commune ne sont pas significativement différentes avec le test de Duncan à $p=0,05$)

DISCUSSION

Pour cette étude, 120 isolats de bactéries et 72 isolats du *Trichoderma* spp. ont été isolés de différentes origines. Ces isolats ont été testés pour identifier leur pouvoir antagoniste vis-à-vis les isolats G1-1 et A5-1 de *Zymoseptoria tritici*.

D'après les résultats de criblage *in vitro*, neuf bactéries et 18 isolats de *Trichoderma* spp. ont été retenus vu leur potentiel élevé d'inhibition de la croissance de *Zymoseptoria tritici*. Des résultats similaires sont rapportés par Levy *et al.*, (1988) et Kildea *et al.*, (2008).

Ce pouvoir pourrait s'expliquer par les différents modes d'action de ces antagonistes, à savoir la compétition, le mycoparasitisme et l'antibiose comme il a été décrit par Dennis et Webster (1971), Windham *et al.*, (1985), Levy et Eyal (1989), Ghisalbert et Sivasithamparam (1991), Harman (2000, 2005), Perello *et al.*, (2002), Howell (2003), Woo *et al.*, (2005), Verma *et al.*, (2007), Kildea *et al.*, (2008) et Lynch (2016) qui ont identifié ces mécanismes chez différents bactéries et champignons antagonistes.

La suite de l'expérimentation implique l'inoculation de ces isolats dans des conditions de plus en plus proches des conditions de plein champ. Pour ce faire, six isolats de *Trichoderma* spp. et huit bactéries les plus performants *in vitro*, ont été sélectionnés pour l'inoculation en pots des variétés Aguilal de blé tendre et Karim de blé dur. Cette inoculation s'est révélée efficace et a réduit considérablement la sévérité de la maladie par rapport aux témoins. Ces résultats s'accordent bien avec ceux de Levy *et al.*, (1988, 1989), Perello *et al.*, (2002), Kildea *et al.*, (2008) et Maumen *et al.*, (2010) qui ont montré la performance de différentes souches de champignons et bactéries antagonistes dans le contrôle de la septoriose ainsi que d'autres maladies foliaires du blé et de l'orge. Cette efficacité pourrait être due aux mécanismes d'action cités précédemment ou bien à l'induction de la résistance de la plante (Maumene *et al.*, 2010)

Aussi, le milieu nutritifs LB (Luria et Burrous, 1957) utilisé pour les bactéries et le milieu de saccharose additionné aux isolats de *Trichoderma* spp. sont très utiles.

Ces milieux favorisent la colonisation et le maintien des micro-organismes antagonistes sur les plantes. Ceci est aussi confirmé par les résultats de ré-isolément effectué à partir des plants 30 jours après l'inoculation par les antagonistes.

Les deux variétés choisies pour les essais *in vivo* ont été sélectionnées selon leur sensibilité très élevée aux isolats G1-1 et A5-1 de *Zymoseptoria tritici*. Ceci est montré par les résultats de l'étude de la sensibilité des seize variétés de blé tendre et dur les plus cultivés au Maroc. Cette étude confirme aussi l'existence d'une interaction spécifique entre les souches de *Zymoseptoria tritici* et les variétés testées. Cela pourrait s'expliquer par l'absence des symptômes de la maladie sur les variétés de blé dur inoculés par la souche G1-1 originaire du blé tendre. Ces résultats s'accordent avec ceux de Mazouz *et al.*, (1995) qui a démontré l'aptitude de *Zymoseptoria tritici* à se spécialiser soit sur le blé dur soit sur le blé tendre. Ceci, souligne l'importance du choix variétal dans l'évaluation de l'activité des antagonistes.

Les résultats obtenus sous conditions contrôlées (essais *in vitro*) et semi-contrôlées (sous serre) sont encourageants et méritent d'être poursuivis en plein champ ainsi que l'identification des mécanismes du pouvoir antagoniste des bactéries et de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de *Zymoseptoria tritici* agent causal de la septoriose du blé.

Remerciements

Nous tenons à remercier le Ministère de l'Éducation Nationale, de la Formation Professionnelle, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique du Royaume du Maroc d'avoir financé le projet de recherche Arimnet intitulé «Bacplant» qui a offert le cadre pour réaliser le présent travail. Nos remerciements également le Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (Maroc) pour son soutien financier dans le cadre du programme de Bourse d'Excellence de Recherche.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dennis C., Webster J. (1971). Antagonistic properties of species of *Trichoderma*, Production of volatile antibiotics. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 57: 41-48.
- Eyal Z., Scharen A. L., Prescott J. M., Ginkel M. V. (1987). The septoria diseases of wheat: Concepts and methods of diseases management. Institutional Multimedia: 1-55.
- Ezzahiri B. (2001). Les maladies du blé: identification, facteurs de développement et méthodes de lutte. *Transfert de Technologie en Agriculture*, 77: 1-4.
- Flaishman M. A., Eyal Z., Zilberstein A., Voisard C., Haas, D. (1996). Suppression of *Septoria tritici* blotch and leaf rust of wheat by recombinant cyanide-producing strains of *Pseudomonas putida*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9: 642-645.
- Ghisalbert E.L., Sivasithamparam K. (1991). Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biol. Biochem.*, 23: 1011-1020.
- Harman G.E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant disease*, 84: 377-393.

- Harman G.E. (2005). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma spp.* *Phytopathology*, 96:190-194.
- Howell C.R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease*, 87: 4-10.
- Kildea S., Ransbotyn V., Khan M.R., Fagan B., Leonard G., Mullins E., Doohan F.M. (2008). *Bacillus megaterium* shows potential for the biocontrol of *Septoria tritici* blotch of wheat. *Biological control*, 47: 37-45.
- Levy E., Eyal Z., Chet I. (1988). Suppression of *Septoria tritici* blotch and leaf rust on wheat seedling leaves by *Pseudomonads*. *Plant Pathology*, 37: 551-557.
- Levy E., Eyal, Z., Carmely S., Kashman Y., Chet I. (1989). Suppression of *Septoria tritici* and *Puccinia recondita* of wheat by an antibiotic-producing fluorescent pseudomonas. *Plant Pathology*, 38: 564-570.
- Lorgue G., Pineau X., Buronfosse F., Berny P. (2002). Circonstances des intoxications des animaux par les pesticides, dans Nichelatti M., Severin F., *Pesticides et protection phytosanitaire dans une agriculture en mouvement*, Paris, ACTA, 976p: 717-723.
- Luria S.E., Burrous J.W. (1957). Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *Journal of Bacteriology*. 74: 461-476.
- Lynch K. M., Zannini E., Guo J., Axel C., Arendt E. K., Kildea S., Coffey A. (2016). Control of *Zymoseptoria tritici* blotch of wheat using antifungal *Lactobacillus* strains. *Journal Applied Microbial*, 121: 485-94.
- Maumene C., Siah A., Ors M. E., Couleaud G., Randoux B., Rigolle P., Selim S., Halama P., Reignault P. (2010). Interaction entre stimulateurs de défense des plantes et génotypes de blé tendre dans la lutte contre la septoriose. *FSOV*: 1-10.
- Mazouz H., Saadaoui E.M., Jlibene M., Lyamani A. (1995). Importance des septorioses du blé au Maroc en 1991. *Al Awamia*. 91: 63-70.
- Perello A.E., Simon M.R., Arambarri A.M. (2002). Interactions between foliar pathogens and the saprophytic microflora of the wheat (*Triticum aestivum* L.) phylloplane. *Journal of Phytopathology*, 150: 232-243.
- Perello A.E., Monaco C.I., Moreno M.V., Cordo C.A., Simon M.R. (2006). The effect of *Trichoderma harzianum* and *T. koningii* on the control of tan spot (*Pyrenophora tritici repentis*) and leaf blotch (*Mycosphaerella graminicola*) of wheat under field conditions in Argentina. *Biocontrol Sci. Technol.*, 16: 803-813.
- Perello A.E., Moreno M.V., Monaco C., Simon M.R., Cordo C. (2009). Biological control of *Septoria tritici* blotch on wheat by *Trichoderma spp.* under field conditions in Argentina. *International Organization of Biological control*, 54: 113-122.
- Verma M., Brar S.K., Tyagri R.D., Surampalli R.Y., Valéro J.R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma spp.*: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37: 1-20.
- Windham M.T., Elad Y., Baker R. (1985). A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma spp.* *Phytopathology*, 76: 518-521.
- Woo S.L., Scala F., Ruocco M., Lorito M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma spp.*, phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, 96:181-185.
- Zadok J.C., Chang T.T., Konzak C.F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14: 415-421.