

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Ecole Doctorale Sciences Exactes et Biologie

THESE

présentée à l'U.F.R. des Sciences Exactes et Naturelles

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Spécialité : Biologie et Physiologie Végétale

par

Souad LOQMAN

Sujet :

**LA LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LA POURRITURE GRISE DE LA
VIGNE: Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales
antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages
d'origine marocaine.**

Soutenue publiquement le 05 Mai 2009, devant le jury :

Président :

Nour-Eddine MEZRIoui Professeur Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc

Examinateurs :

Ahmed BENHARREF Professeur Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc

Jean-Hugues RENAULT HDR Université de Reims Champagne-Ardenne, France

Essaid AIT BARKA HDR Université de Reims Champagne-Ardenne, France

Christophe CLEMENT Professeur Université de Reims Champagne-Ardenne, France

Yedir OUHDOUCH Professeur Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc

*Aux miens, grâce à qui j'ai eu la chance de
mener à bien mes études dans les meilleures
conditions*

Remerciements

Les travaux présentés font l'objet d'une thèse en cotutelle au sein du Laboratoire de Biologie et de Biotechnologie des Microorganismes, Faculté des Sciences Semlalia, UCAM Marrakech sous la direction du Professeur Yedir OUHDOUCH conjointement avec le Laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes, Université de Reims Champagne-Ardenne sous la direction de Dr. Essaid Ait BARKA et Professeur Christophe CLEMENT.

Ces quelques lignes vont me permettre de remercier les responsables et personnes qui ont contribué de près ou de loin pour la réalisation de ce travail soit au niveau scientifique mais aussi personnel, et sans qui, mon travail n'aurait pu aboutir.

Je tiens d'abord à remercier Messieurs le Président de l'Université Cadi Ayyad et le Doyen de la Faculté des Sciences Semlalia de Marrakech, et le Président de l'Université de Reims Champagne-Ardenne pour l'effort et le soutien qu'ils accordent à la recherche scientifique.

J'adresse ma gratitude et je remercie le Professeur Yedir OUHDOUCH et Docteur Essaid Ait BARKA et le Professeur Christophe CLEMENT qui ont dirigé ce travail, ça ne sera pas suffisant pour leur exprimer toute ma grande reconnaissance pour la confiance, la disponibilité, la générosité et le grand soutien qu'ils m'ont accordée pour faire avancer ce travail.

Mes profonds remerciements vont également à Mr. Jean-Marc NUZILLARD, Professeur et Directeur du laboratoire de Pharmacognosie CNRS-UMR 6013 de Reims et le Docteur Jean-Hugues RENAULT pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire, pour leur aide précieuse dans la purification et l'élucidation Structurale des molécules bioactives. Merci également à Alix TORIBIO pour son aide, sa disponibilité, sa gentillesse, son amitié et pour ses conseils théoriques et pratiques qui m'ont beaucoup aidée à avoir utiliser la CPC. Ainsi que toute l'équipe du laboratoire de Pharmacognosie.

Je remercie vivement le Professeur Fabienne Baillieul de l'Equipe Biochimie et Biologie Moléculaire des Plantes (BBMP) de Reims, pour toute l'aide qu'elle m'a apportée en biologie moléculaire, et pour la patience dont elle a fait preuve à mon égard. Merci à Funja, Sandra, Stéphane et à toute l'Equipe BBMP pour m'avoir adoptée quelques temps dans leur laboratoire et pour les informations et les conseils lors de la réalisation de ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur H. P. Klenk, Professeur et directeur du laboratoire DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, pour son aide précieuse dans la confirmation de nouvelles espèces d'actinomycètes.

J'adresse aussi mes remerciements au Professeur Abderrahmane CHAIT, Responsable de l'UFR « Biologie, Santé et Environnement » pour ses encouragements et son soutien moral et aussi pour l'estime qu'il a toujours manifestée à mon égard.

Je remercie vivement Monsieur le professeur Noureddine MEZRIOUI pour avoir accepté de présider le jury de la soutenance de ma thèse. Mes remerciements sont aussi adressés aux membres de jury Messieurs les Professeurs, Ahmed BENHAREF, Jean-Hugues RENAULT, Moha JANA. Qu'ils acceptent ici mes sentiments de gratitude pour le grand intérêt qu'ils ont accordé au sujet de ma thèse.

Mes remerciements au Dr. DUPONNOIS Robin, Chercheur Laboratoire Commun de Microbiologie IRD, centre de recherche de Bel Air, Dakar, Sénégal et le Pr. AMAR Mohamed, chef du laboratoire de Biologie Moléculaire et Microbiologie, CNRST Rabat, Maroc et suis très honoré qu'ils aient voulu accepter d'être rapporteurs.

Je tiens également à remercier vivement les membres de Laboratoire de microbiologie : les Professeurs : H. HASSANI, N. MEZRIOUI, L. RAFOUK, B. IMZILN, K. OUFDOU, EH. HIMMI, A. KHAMAM, A. BOUSSAID, N. OUAZZANI pour leur soutien et encouragement et de m'avoir permis de bien mener ce travail au sein du laboratoire de Biologie et de Biotechnologie des Microorganismes de la FSSM Marrakech.

J'adresse un remerciement particulier à Mr. Mohammed HAFIDI, Professeur à la Faculté des Sciences Semlalia de Marrakech, pour son aide, ses précieux conseils scientifiques avisés qu'il m'a prodigué. C'est avec plaisir que je vous témoigne toute ma reconnaissance.

Je remercie Messieurs OUTZOURITE et Rachid le technicien du laboratoire de la microscopie électronique à balayage du département de physique (FSSM) qui nous ont permis la réalisation des observations en microscopie électronique de nos souches actives.

J'exprime mes profonds remerciements à tous les membres du Laboratoire de Stress Défenses et Reproduction des plantes de l'Université de Reims Champagne-Ardenne pour la bonne ambiance qui règne quotidiennement au laboratoire et qui m'a permis de travailler dans d'excellentes conditions. Un merci spécial à Stéphane COMPANT, Cédric JACQUARD, Gaël LEBON, Isabelle PROULT, Anne-Marie HAMALIAN, Cathy HACHET, Dali, Andreas,.....

Finalement, j'exprime mes remerciements à tous mes collègues, ami(e)s et personnels du Laboratoire de Biologie et de Biotechnologie des Microorganismes à la Faculté de Sciences Semlalia Marrakech: Brahim BOUIZGARNE, Meriem ANIBOU, Hanane HAMDALI, Asmaä JALIL, Asmaä SAAD, Asmaä BENSALTANA, Houda ABOUSSAID, Mariam Fadili, Faycel, Achraf, Salah, Si Mohamed tous mes ami(e)s et collègues, sans oublier la gentillesse, la sympathie et les encouragements de Raja BOUÄCHERINE, Majida BAROUDI, Malika ,Khadija, Ba Hessayene et Naima FAKIHANI. Je remercie aussi mes amies du secrétariat et de la bibliothèque Fatna , Naima, Raja et Jamila.

J'adresse également mes remerciements à l'ensemble des membres de la famille AIT BARKA, en particulier Hassna et Essaid qui ont contribué à rendre mon séjour agréable à Reims. Qu'ils trouvent ici ma profonde reconnaissance.

En outre, la réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien moral et affectif de mes parents et de mon mari qui m'ont donné la force et le courage de continuer sur ce chemin. Je remercie Chakir, Youness, Rajae, Amal, Achraf, Imane ainsi tous les membres de ma famille qui ont su me comprendre dans les moments les plus difficiles lors de mes déplacements et mes absences.

A mon mari, Khalil EZZINBI, qu'il trouve ici toute mon affection et mon amour.

Un grand hommage en dernier à mon père qui n'a pas pu voir le fruit de ce travail.

Enfin, j'adresse une pensée toute particulière à tous ceux que j'ai eu le plaisir de rencontrer en France et ailleurs.

FICHE PRESENTATIVE DE LA THESE

Nom et prénom de l'auteur: Souad LOQMAN

Intitulé du travail : La Lutte biologique contre la pourriture grise de la Vigne : Isolement et caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine.

Encadrants :

- Nom, Prénom et grade : OUHDOUCH Yedir, Professeur.

Laboratoire et institution : Laboratoire de Biologie et Biotechnologie des Microorganismes,

Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia-Marrakech, Maroc.

- Nom, Prénom et grade : CLEMENT Christophe, Professeur et AIT BARKA Essaid, HDR.

Laboratoire et institution : Laboratoire Stress, Défenses et Reproduction des Plantes, Equipe

de Recherche Vignes et Vins De Champagne, Stress Environnement, EA 2069, Université de

Reims Champagne-Ardenne, France.

Laboratoires où les travaux de cette thèse ont été réalisés :

- Laboratoire de Biologie et Biotechnologie des Microorganismes, Faculté des Sciences Semlalia-Marrakech, Maroc.

- Laboratoire Stress, Défenses et Reproduction des Plantes, Equipe de Recherche Vignes et Vins de Champagne, Stress Environnement, EA 2069, Université de Reims Champagne-Ardenne, France.

- Laboratoire de Pharmacognosie (FRE CNRS 2715, IFR 53), Université de Reims Champagne-Ardenne, France.

Rapporteurs autres que l'encadrant (nom, prénom, grade, institution) :

- MEZRIOUI Nour-Eddine, Professeur de l'enseignement supérieur, Laboratoire de Biologie et Biotechnologie des Microorganismes, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc.
- AMAR Mohamed, Professeur de l'enseignement supérieur, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Microbiologie, CNRST Rabat, Maroc.
- DUPONNOIS Robin, Chercheur Laboratoire Commun de Microbiologie IRD /ISRA/ UCAD. Centre de recherche de Bel Air, Dakar, Sénégal.

Cadre de Coopération-soutien financier :

- Projet de recherche et développement franco-marocain PRAD 02/02.
- Projet Action Intégrée Maroco-Française N° MA/04/109F

Ce travail a donné lieu aux résultats suivants (communications, publications,...) :

Publications:

1. **Loqman S.**, Ait Barka E., Clément C. and Ouhdouch Y. Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (2009), 28: 81-91.
2. **Loqman S.**, Ait Barka E., Clément C. and Ouhdouch Y. Correlation between endophytic potential and anti-Botrytis activity of Actinomycetes isolated from rhizospherical Moroccan grapevine. Soumis pour publication à *Biological control*.
3. **Loqman S.**, Ait Barka E., Clément C. and Ouhdouch Y. Growth promoting effect on *Vitis vinifera* L. of antagonistic actinomycetes isolated from rhizospherical Moroccan grapevine. Soumis pour publication à *Biological control*.
4. **Loqman Souad**, Bouizgarne Brahim., Ait Barka Essaid, Clément Christophe, Spröer Catherine, Klenk Hans-Peter, Ouhdouch Yedir. *Streptomyces thinghirensis* sp. nov., a novel bacterium isolated from rhizosphere soil of *Vitis vinifera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2009), in press
5. Bouizgarne Brahim., Benjamin Lanoot, **Loqman Souad**, Spröer Catherine, Klenk Hans-Peter, Jean Swings, Ouhdouch Yedir. *Streptomyces marokkonensis* sp. nov., a novel bacterium isolated from rhizosphere soil of *Argania spinosa* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2009), in press

6. Loqman S., Toribio A., Harakat D., Nuzillard J.M., Renault J.H., Ait Barka E., Clément C. and Ouhdouch Y. Purification of antibiotics from antagonistic *Streptomyces* sp. nov., a novel *Streptomyces* isolated from rhizospherical soil of Moroccan healthy *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography. En préparation pour la soumission au *Journal of Chromatography B.*.

7. Loqman S., Rabenoelina F., Baillieul F., Renault J.H., Nuzillard J.M., Ait Barka E., Ouhdouch Y., Clément C. Induced defense responses in *Vitis vinifera* L. by *Streptomyces* sp. nov compounds and its related systemic resistance towards early infection by *Botrytis cinerea* Pers.. En préparation.

Brevet :

« New actinomycetes strain compositions and their use for the prevention and/or the control of micro organism inducing plant diseases ».

- Demande déposée le 31 mars 2009 sous le numéro EP 09 290 240.2.

Communications:

1. Loqman S., R. Errakhi, M. Anibou, M. Barakate &Y. Ouhdouch. Bactéries actinomycétales productrices de molécules antivirales. La Première Rencontre Scientifique des Etudiants DESA et DOCTORANTS, Etat et Perspectives en Sciences Biologiques ; 5 et 6 Juin 2003, Marrakech-Maroc.

2. Anibou M., Loqman S., Errakhi R., Barakate M. & Ouhdouch Y.. Screening primaire de quelques souches actinomycétales productrices d'antibiotiques à activité anti-tumorale. La Première Rencontre Scientifique des Etudiants DESA et DOCTORANTS, Etat et Perspectives en Sciences Biologiques ; 5 et 6 Juin 2003, Marrakech-Maroc.

3. Barakate M., Errakhi R., Loqman S. & Ouhdouch Y. Les Actinomycètes en Biotechnologie, Lutte Biologique contre les maladies phytopathogènes. Workhop International : Apport des biotechnologies en production intégrée ; 13 Décembre 2003, Hôtel Agdal –Marrakech-Maroc.

4. Anibou M., Errakhi R., Hamdali H., Loqman S., Barakate M., Zyad A., Chait A., Ouhdouch Y. Antitumor activity of some Actinomycetes strains isolated from the rhizospheric soil from the Moroccan endemic plants. International conference of Molecular Chemistry and Bioactive Molecules. Faculty of Sciences Meknès, University Moulay Ismail. 04-05 May 2006. Meknès- Maroc.

5. Loqman S., Ait Barka E., Clement C., Hamdali H., Anibou M., Ouhdouch Y. Screening of the Actinomycetes bacteria of Moroccan origin producing the antifongic ones, the study of the induced mechanisms of defense and development of a systemic biofungicide against *Botrytis cinerea* agent of the gray rot at the vine. Journées Actinomycètes 2006. Ecole Centrale de Lyon, INSA, Université Claude Bernard Lyon I. 14-15 Juin 2006. Lyon- France.

6. Hamdali H., Loqman S., Anibou M., Barakate M., Esnault C., Lebrihi A., Virolle M.J. Ouhdouch Y. Actinomycètes des mines de phosphate Marocaines : Criblage et caractérisation de souches solubilisatrices du phosphate minéral. Journées Actinomycètes 2006. Ecole Centrale de Lyon, INSA, Université Claude Bernard Lyon I. 14-15 Juin 2006. Lyon- France.

7. Anibou M., Errakhi R., Hamdali H., Loqman S., Barakate M., Zyad A., Chait A., Ouhdouch Y. Actinomycetes of the rhizospheric soil of some Moroccan endemic plants: Screening of stocks with Cytotoxic activity. Journées Actinomycètes 2006. Ecole Centrale de Lyon, INSA, Université Claude Bernard Lyon I. 14-15 Juin 2006. Lyon- France.

8. Loqman S., Ait Barka E. , Clément C., Hamdali H., Anibou M. et Ouhdouch Y. Screening des bactéries actinomycétales d'origine marocaine productrices d'antifongiques et développement d'un biofungicide systémique contre les pathogène de la vigne : cas de *Botrytis cinerea* agent de la pourriture grise. II ème Symposium International sur les plantes aromatiques et médicinales Marrakech 14 -16 septembre 2006.

9. Hamdali H., Loqman S., Anibou M., Hafidi M., Lebrihi A., Ouhdouch Y. La solubilisation bactérienne du phosphate minéral Marocain : cas des Actinomycètes isolés des mines des phosphates. II ème Symposium International sur les plantes aromatiques et médicinales. 14-16 Septembre 2006. Marrakech- Maroc.

10. Loqman S., Ait Barka E., Clément C., Hamdali H., Anibou M., Ouhdouch Y. Scrrening des bactéries actinomycétales d'origine marocaine productrices d'antifongiques et développement d'un biofungicide systémique contre les pathogène de la vigne : cas de *Botrytis cinerea* agent de la pourriture grise. La deuxième rencontre nationale du pôle de compétence (MisobioP) : Bilan et perspectives. 25-27 Novembre 2006. Fès- Maroc.

11. Anibou M., Loqman S., Hamdali H., Barakate M., Zyad A., Chait A., Ouhdouch Y. Souches Actinomycétales des sols rhizosphériques de quelques plantes endémiques Marocaines: Isolement et activité cytotoxique. Congrès International sur les Plantes Médicinales et Aromatiques. Faculté de Médecine Fès. 22-24 Mars 2007. Fès- Maroc.

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Résumé

Abstract

INTRODUCTION GENERALE	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	6
1. La vigne (<i>Vitis vinifera</i>)	6
1.1. Présentation générale du développement de la vigne.....	6
1.1.1. Présentation botanique	6
1.1.2. Cycle de développement	8
1.2. La vigne et ses pathogènes	11
2. <i>Botrytis cinerea</i> agent de la pourriture grise de la vigne.....	11
2.1. Classification	11
2.2. Cycle biologique	12
2.3. L'infection de la plante par <i>B.cinerea</i>	14
3. La résistance naturelle des plantes.....	16
3.1. Reconnaissance de l'agent pathogène.....	16
3.2. Réponses cellulaires	17
3.3. Signalisation intercellulaire.....	19
3.4. Les composés de défenses	19
3.5. Les mécanismes de défenses	22
3.5.1. La réponse hypersensible ou HR.....	22
3.5.2. La résistance locale acquise ou LAR	22
3.5.3. La résistance systémique acquise SAR	23
3.6. Les défenses chez la vigne	23
4. Les méthodes alternatives à la résistance naturelle des plantes.....	25
4.1. Les pratiques culturales	25
4.2. La lutte chimique.....	25
4.3. Les plantes transgéniques.....	26

4.4. La lutte biologique	26
4.4.1. L'antibiose et la production d'antibiotique	27
4.4.2. Compétition pour le fer et la production de siderophores	28
4.4.3. Parasitisme et production des enzymes	28
4.4.4. Promotion de la croissance de la plante	29
4.4.5. Renforcement de la capacité défensive de la plante.....	30
5. Les microorganismes bénéfiques.....	30
5.1. Les champignons bénéfiques ou les PGPF	33
5.2. Les bactéries bénéfiques PGPB ou les PGPR	34
6. Les Actinomycètes.....	35
6.1. Généralités.....	35
6.2. Les actinomycètes dans le sol	37
6.3. Relations plantes-Actinomycètes	39
6.4. Les antibiotiques produits par les actinomycètes	40
6.5. Taxonomie des actinomycètes	42
6.5.1. Classification des actinomycètes.....	42
6.5.1.1. Classification morphologique	42
6.5.1.2. Classification chimiotaxonomique	47
6.5.1.3. Classifications moléculaires	51
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	53
RESULTATS EXPERIMENTAUX	84
<u>CHAPITRE I:</u> Criblage et caractérisation d'Actinomycètes antagonistes de champignons phytopathogènes à partir d'habitat Marocains	84
Présentation de la publication 1	84
Publication 1: Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold.....	85
<u>CHAPITRE II:</u> Actinomycètes promoteurs de la croissance des plantes (PGPR) en tant qu'agents de lutte biologique.....	96

Présentation des publications	96
Publication 2: Correlation between endophytic potential and anti-Botrytis activity of Actinomycetes isolated from rhizospherical Moroccan grapevine	101
Publication 3: Growth promoting effect on <i>Vitis vinifera</i> L. of antagonistic actinomycetes isolated from rhizospherical Moroccan grapevine	128
<u>CHAPITRE III: Identification des isolats actinomycétales antagonistes sélectionnés ..</u>	152
Présentation	152
Publication 4: <i>Streptomyces thinghirensis</i> sp. nov., a novel bacterium isolated from rhizosphere soil of <i>Vitis vinifera</i>	157
<u>CHAPITRE IV: Purification et élucidation structurale de quelques antibiotiques produits par une des souches d'Actinomycètes sélectionnées ..</u>	174
Présentation de la publication	174
Publication : Purification of antibiotics from antagonistic <i>Streptomyces</i> sp. nov., a novel <i>Streptomyces</i> isolated from rhizospherical soil of Moroccan healthy <i>Vitis vinifera</i> by centrifugal partition chromatography.....	176
<u>CHAPITRE V: 1 Induction des mécanismes de défenses de la vigne par les produits purifiés élaborés par une des souches sélectionnées ..</u>	198
Présentation	198
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	204
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	210
ANNEXES.....	217

Liste des Abréviations

ADN ou DNA	Acide désoxyribonucléique ou desoxyribonucleic acid
AIA	Acide Indole Acétique
ATP	Adénosine Triphosphate
ARN ou RNA	Acide ribonucléique ou ribonucleic acid
Avr	Avirulence
AO	Acide oxalique
AOA	Active oxygen species
Ca	Calcium
Cl	Chlore
CO ₂	Dioxyde de carbone
CPC	Chromatographie de Partage Centrifuge
ET	Ethylène
FAO	Forme active de l'oxygène
GUS	β -glucuronidase
GFP	“Green Fluorescent Protein” ou protéine verte fluorescente
H	Heure
HPLC	Chromatographie liquide à Haute Performance
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HO ₂ •	Radical hydroperoxyle
HR	“Hypersensitivity Response” ou réponse hypersensible
ISP	International Streptomyces Project
ISR	“Induced Systemic Resistance” ou résistance systémique induite
min	Minutes

mM	Millimoles, millimolaires
JA	Acide jasmonique
LAR	“Local Acquired Resistance” ou résistance locale acquise
LOX	Lipoxygénase
LPS	Lipopolysaccharides
MAMP	“Microbe-Associated Molecular Pattern” ou profil moléculaire associé aux microbes
MIMP	“Microbial-Induced Molecular Pattern” ou profil moléculaire induit par des microorganismes
MF	Matière fraîche
NO	Oxyde nitrique
O ₂ •-	Anion superoxyde
OEMPP	Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes
OGM	Organismes génétiquement modifiés
OH.	Radical hydroxyle
P	Phosphore (élément)
PAMP	“Pathogen-Associated Molecular Pattern” ou profil moléculaire associé aux agents pathogènes
PGIP	“PolyGalacturonase Inhibiting Proteins” ou protéines inhibant la polygalacturonase
PGPB	“Plant Growth-Promoting Bacteria” ou bactéries stimulant la croissance des plantes
PGPF	“Plant Growth-Promoting Fungi” ou champignons stimulant la croissance des plantes
PGPR	“Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria” ou rhizobactéries stimulant la croissance des plantes
PGPY	“Plant Growth-Promoting Yeasts” ou levures stimulant la croissance des plantes
PM	Poids moléculaire

PR	“Pathogenesis-Related” ou associé à la pathogénécité
q.s.p.	Quantité suffisante pour
R	Résistant
Rpm	Rotations par minute
S.	<i>Streptomyces</i>
SA	Acide salicylique
SAR	“Systemic Acquired Resistance” ou résistance systémique acquise
spp.	Espèce
UFC	Unité formatrice de colonies

LISTE DES TABLEAUX

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE :

Tableau 1: Les différents types de protéines PR d'après Van Loon et al. (2006b).....	21
Tableau 2: Les microorganismes inscrits en tant que biopesticides à l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (EPA) (Fravel, 2005).....	31
Tableau 3: Exemple d'antifongiques produits par les actinomycètes utilisés en agriculture .	41
Tableau 4: Différents types de parois et leurs constituants majeurs chez les actinomycètes (Murray <i>et al.</i> , 1989)	50

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Chapitre I

Publication 1:

Table 1: Biochemical and morphological characteristics of the nine active isolates	92
Table 2: Percentage of sequence identity to the sequence of 16S RNA of other Actinomycetes strains	93

Chapitre II

Publication 3:

Table 1: influence of the five Actinomycete isolates on <i>in vitro</i> growth parameters of <i>V. Vinifera L.</i>	139
Table 2: Antimicrobial activities of five Actinomycete isolates on selected media at 28 °C (n=3)	143

Chapitre III

Publication 4:

Table 1: fatty acid pattern of <i>Streptomyces thinghirensis</i> DSM 441919 ^T , <i>Streptomyces marokkonensis</i> DSM 41918 ^T , <i>S. lienomycini</i> DSM 40477 ^T , and <i>S. cinnabarinus</i> DSM 40467 DSM 41918 ^T	165
Table 2: Phenotypic characteristics that differentiate strain S10 ^T (1) from related Streptomyces species, <i>Streptomyces marokkonensis</i> DSM 41918 ^T (2), <i>Streptomyces aurantiogriseus</i> DSM 40138 ^T (3), <i>Streptomyces coelicolor</i> DSM 40783 (4), <i>Streptomyces violaceolatus</i> DSM 40438 ^T (5) and <i>Streptomyces coelescens</i> DSM 40421 ^T (6)	168

Chapitre IV

Publication 4:

Table 1: Compounds isolated characteristics of the <i>Streptomyces</i> sp. butanolic extract by CPC	191
--	------------

LISTE DES FIGURES

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1: Le marché des biopesticides microbiens en 2005 (Thakore, 2006)	3
Figure 2 : Principaux cépages greffés cultivés dans la région champenoise avec en haut la morphologie caractéristique des feuilles et en bas celle des baies matures. A) Chardonnay, B) Pinot Meunier et C) Pinot noir Reynier (1989).....	7
Figure 3: Cycle de développement de la vigne d'après Reynier (1989).....	9
Figure 4: Stades repères de la vigne selon la classification de Baggioolini (1952) pour les lettres et selon Eichhorn & Lorenz (1977) pour les chiffres	10
Figure 5: Cycle d'infection de <i>Botrytis cinerea</i> chez la vigne d'après Perret (2001).....	13
Figure 6: Symptômes de <i>Botrytis cinerea</i> sur des organes végétatifs de la vigne. (a) au niveau foliaire, (b) au niveau caulinaire, (c) sur capuchon floral en fin de floraison, (d) sur baie au stade véraison, (e) sur baie en maturation et (f) formation de spores permettant de nouvelles infections (Bugaret, 2002 ; Clark, 2002).....	15
Figure 7: Cycle de développement des Actinomycètes sur milieu solide (Breton <i>et al.</i> , 1989).	37
Figure 8: Morphologie des spores des actinomycètes (Breton <i>et al.</i> , 1989)	44
Figure 9: Différents chaînes de spores chez les Actinomycètes ; spores endogènes (A) et spores exogènes (B) (Breton <i>et al.</i> , 1989).....	46
Figure 10: Classification du phylum des Actinobactéria basées sur des données de séquençage de l'ARNr. 16S. La barre représente 5 substitutions de nucléotides par 100 nucléotides (Stackebrandt <i>et al.</i> , 1997)	52

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Chapitre I

Publication 1:

Figure 1: Interaction between selected actinomycetes and <i>B. cinerea</i> when inoculated together on PDA (distance confrontation). (a: ST16; b: SS27; c: SSh18; d: SS39; e: SS40; f: SS6; g: SS38; h: SS5; i: SSh10; J: SS22). The fungus is in the centre of the Petri dish.....	88
--	-----------

- Figure 2:** Hyphal mycelium from the zone of interaction between *B. cinerea* and actinomycetes isolates. a: Normal hypha of *B. cinerea*. b-d: Mycelium taken in the zone of interaction between *B. cinerea* and isolate SS38. b: Partially emptied mycelium. c: Big vesicles in the mycelium. d: Emptied mycelium (arrow). Bar = 40 µm (a), 100 µ (b-d) 89
- Figure 3:** Inoculation experiments on detached leaves of *V. vinifera* with *B. cinerea*: (a) Leaves from control plantlets; (b) leaves inoculated with actinomycete (isolate SS38); (c) leaves inoculated with *B. cinerea* and exhibiting the symptoms of gray mold disease; (d) leaves pre-treated with isolate SS38 before their inoculation with *B. cinerea* showing enhanced resistance toward the pathogen. Bar = 2 cm 90
- Figure 4:** Grapevine plantlets: (a) Control plantlets; (b) control plantlets+ *B. cinerea* showing the visual symptoms of gray mould; (c) plantlets inoculated with isolate SS38; (d) plantlets pre-treated with actinomycete isolate before their inoculation with *B. cinerea* showing enhanced resistance toward the pathogen. Bar = 1 cm 91
- Figure 5:** Light micrographs of samples from grapevine leaves. (a) Sample from the untreated (control) grapevine leaves; (b) leaves inoculated with actinomycetes (isolate SS38); (c) leaves inoculated with *B. cinerea* and exhibiting the symptoms of gray mold disease; The hyphae of the pathogen abundantly colonize the epidermis and the parenchyma. Fungal growth occurs both intracellularly and intercellularly. Pathogen ingress inside the leaf coincides with local cell wall alterations (arrows). (d) leaves pre-treated with isolate SS38 before their inoculation with (*B. cinerea*=bc) showing enhanced resistance toward the pathogen as fungal growth is mainly restricted to the epidermis 91

Chapitre II

Publication 2:

- Figure 1:** Effect of Actinomycetes on hyphal mycelium growth when inoculated together on grapevine tissue extract agar medium 111
- Figure 2:** Hyphal mycelium from the zone of interaction between *B. cinerea* an actinomycetes isolates. a: Normal hypha of *B. cinerea*. b-d: Mycelium taken in the zone of interaction between *B. cinerea* and *Streptomyces anulatus*-related strain (SS38). b: Partially emptied mycelium. c: Big vesicles in the mycelium. d: Emptied mycelium (arrow). Bar = 40 µm (a), 100 µ (b-d)..... 113

Figure 3: <i>Botrytis cinerea</i> hyphae stained with Calcofluor white (A-B) and Nile red (C-D). (B-D) effect of actinomycete on fungal hyphae. (A-C) Untreated fungi. Bar=40 µm.....	114
Figure 4: (A) <i>In vitro</i> responses of grapevine plantlets co-cultured with <i>Streptomyces anulatus</i> -related strain (SS38); (B-a) Microscopic observation showing emergence of SS38 mycelia from disinfected root cuttings (B-b) test of the presence of Actinomycete colonies in leaf tissues sampled from bacterized plantlets after four days of incubation on solid Bennett medium; (1) First generation, (2) Second generation, (3) Third generation, (T) control plantlets	116
Figure 5: Grapevine plantlets: (a) nonbacterized plantlets; (b) nonbacterized plantlets + <i>B. cinerea</i> ; (c) Bacterized plantlets; (d) bacterized plantlets + <i>B. cinerea</i>	117
Figure 6: Photographs of endoglucanase activities of (a) <i>Micromonospora flavogrisea</i> -related strain (SS40); (b) <i>Streptomyces fimicarius</i> -related strain (SS22); (c-d) <i>Streptomyces anulatus</i> related strain (SSh10) and (SS38) respectively; (e) <i>Micromonospora flavogrisea</i> -related strain (SS39).....	117

Publication 3:

Figure 1: (A) <i>In vitro</i> responses of grapevine plantlets co-cultured with <i>Streptomyces anulatus</i> -related strain (SS38); (B-a) nonbacterized plantlets; (B-b) nonbacterized plantlets + <i>B. cinerea</i> ; (B-c) Bacterized plantlets; (B-d) bacterized plantlets + <i>B. cinerea</i>	138
Figure 2: Concentration of soluble phosphate released from rock phosphate in the supernatant of cultures of the 5 selected isolates grown for five days in SMM containing 0.5 g l-1 RPK and in the medium of the non-inoculated flasks incubated in the same conditions (control)	141
Figure 3: Cellulose disks impregnated with 20 µl of solution of Desferrioxamine B at different concentration or with 20 µl of eight fold concentrated culture supernatants of cultures of the 5 selected isolates and of the control grown for 5 days in liquid SMM containing 0.5 g l-1 RPK and deposited on the surface of a CAS-blue agar plate.....	141

Chapitre III

Presentation:

Figure 1 : Arbre phylogénétique montre le % d'identité de la souche SS10 avec la séquence de l'ADN 16S des espèces les plus proche.....	153
Figure 2 : Arbre phylogénétique montre le % d'identité de la souche SS38 avec la séquence de l'ADN 16S des espèces les plus proche.....	154

Figure 3 : Arbre phylogénétique montre le % d'identité de la souche SS40 avec la séquence de l'ADN 16S des espèces les plus proches.....155

Publication 4:

Figure 1: Micrographs showing spore chains (a) and spores shape (b) of *Streptomyces thinghirensis* sp. nov. grown on ISP2 for 14 days at 28 °C164

Figure 2: Unrooted Maximum Likelihood phylogeny based on 1436 aligned positions of 16S rRNA gene showing the phylogenetic relationships between strain S10T (DSM41919T, '*Streptomyces thinghirensis*') and the most closely related *Streptomyces* type species. Bootstrap values (%) above the branches were derived from 1000 replications of maximum likelihood inferences, those below the branches give the maximum support by 1000 replications, each, of maximum parsimony, neighbour-joining, and least square (FITCH) inferences. The scale bar corresponds to 0.001 substitutions per nucleotide position.....167

Chapitre IV

Publication 5:

Figure 1 : FCPC Kromaton Technologies®182

Figure 2: The Thin Layer Chromatography analysis illustration on each of the phases gotten after liquid-liquid fractionation dividing of an butanolic extract of *Streptomyces* sp. containing some bioactifs and inactive compounds from the triphasic system n-Hept / MtBE / CH₃CN / Water (1/1/2/1, v/v); CCM normal phase eluted with CH₂Cl₂/CH₃OH (1 :9, v/v), revealed with sulphuric vanillin.....186

Figure 3 : The Thin Layer Chromatography analysis illustration on each of the phases gotten after liquid-liquid fractionation dividing of an butanolic extract of *Streptomyces* sp. containing some bioactifs and inactive compounds from the biphasic system n-Hept / CH₃OH / Water (5 :1,5 :3,5 and 5 :3,5 :1,5, v/v) ; CCM normal phase eluted with CH₂Cl₂/CH₃OH (1 :9, v/v), revealed with sulphuric vanillin186

Figure 4: The Thin Layer Chromatography analysis illustration on each of the phases gotten after liquid-liquid fractionation dividing of an butanolic extract of *Streptomyces* sp. containing the compounds 3, 4 and 7 from the biphasic system n-Hept / CH₃CN (1 :1, v/v) and n-Hept /

CH ₃ CN / Water (5 :5 :1; 5 :5 :2; 5 :5 :4 and 5 :5 :6, v/v); PS: superior phase, PI,: lower phase; CCM normal phase eluted with CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (1 :9,v/v), revealed with sulphuric vanillin	188
Figure 5: The chromatograms obtained from CPC experiments A and B	189
Figure 6: The Thin Layer Chromatography analysis illustration regrouped fractions containing the compounds 2, 3, 4, 5, 7 and unidentified substances isolated of an butanolic extract of <i>Streptomyces</i> sp. CCM normal phase eluted with CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (1 :9, v/v), revealed with sulphuric vanillin	190
Figure 7: chemical structure of the compounds 2 and 3 isolated of the <i>Streptomyces</i> sp. butanolic extract by CPC.....	193
Figure 8: chemical structure of the compound 7 isolated of the <i>Streptomyces</i> sp. butanolic extract by CPC	193
Figure 9: Antimicrobial activities of isolated compounds from the strain SS38 extract against <i>Botrytis cinerea</i> in solid media.....	194

Chapitre V

Publication 5

Figure 1: Effet des produits sécrétés par <i>Streptomyces</i> sp. nov. sur la croissance de <i>Botrytis cinerea</i> par le test de confrontation locale (a : effet des produits 2,3,4,5,7 ; b : effet du produit 10 ; c : Témoin ; BC : <i>Botrytis cinerea</i>)	201
Figure 2: Effet des produits sécrétés par <i>Streptomyces</i> sp. nov. sur la croissance de <i>Botrytis cinerea</i> par le test de confrontation à distance (BC: <i>Botrytis cinerea</i> et 2,3,4,5,7 et 10 : les produits)	201
Figure 3: Effet des produits sécrétés par <i>Streptomyces</i> sp. nov. sur la protection des plantes vis-à-vis <i>Botrytis cinerea</i> (a : plante témoin, b : <i>Botrytis cinerea</i> , c : <i>Botrytis cinerea</i> + produit 2 ; d :10 : effet du produit 10)	202
Figure 4: Expression de quelques gènes codant pour des protéines PR chez la vigne par des produits sécrétés par <i>Streptomyces</i> sp. nov	203

RESUME

L'objectif de ce travail de thèse s'inscrit dans la recherche et le criblage des actinomycètes PGPR capables de jouer un rôle important dans la lutte biologique contre *Botrytis cinerea* agent de la pourriture grise de la vigne, de promouvoir la croissance et/ou d'induire les mécanismes de défenses chez cette dernière.

L'isolement des actinomycètes a été réalisé à partir des sols rhizosphériques de la vigne saine sauvage du Maroc (Errachidia, Sahara, Skoura, Tinjdad , Tinghir). Ainsi, 24 isolats (17%) parmi les 142 isolats se sont avérés capables de limiter la croissance de 4 champignons tests et seulement 9 isolats sélectionnés actifs sur les cinq champignons test y compris *Botrytis cinerea*. Nous avons montré que les 9 souches sélectionnées cultivent bien le milieu à base des exsudats racinaires. Cependant, 5 isolats seulement présentent un pouvoir antagoniste important vis-à-vis *B. cinerea* sur ce milieu. Les études microscopiques des hyphes de *Botrytis cinerea* prélevés au niveau de la zone de confrontation avec les actinomycètes antagonistes montrent une dégradation partielle ou totale. Ceci a été confirmé par des observations réalisées en microscope à fluorescence en utilisant les colorants vitaux tels que le Red Nile et le Calcofluor white. Ces 5 souches montrent des propriétés PGPR, colonisent les surfaces racinaires, puis pénètrent dans les racines jusqu'aux feuilles de vitro plantules de vigne (*Vitis vinifera L.*). De plus, en présence de ces souches, les plantes ne présentent pas les symptômes de la pourriture grise.

L'identification des isolats sélectionnés par l'étude des caractères morphologiques, biochimiques et moléculaires a été réalisée. L'hybridation ADN/ADN avec les souches apparentées a confirmé que trois souches antagonistes SS38, SS40 et SS10 correspondent bien à des nouvelles espèces appartenant au genre *Streptomyces*. La souche SS38 a été retenue pour des investigations concernant la détermination de la structure moléculaire des principes actifs élaborés. En effet, nous avons pu purifier et identifier plusieurs molécules à partir de cette souche.

La dernière partie de ce travail a été consacrée à une étude préliminaire de l'effet protecteur et/ou éliciteur des produits élaborés par la souche SS38. Ainsi nous avons montré que 5 des 6 produits purifiés montrent un pouvoir antagoniste *in vitro* et *in vivo* vis-à-vis de *B. cinerea*. De plus, certains de ces produits stimulent les mécanismes de défenses de la plante par une induction locale et systémique des gènes *VvGluc*, *VvPR6* et *VvChi4C* codant respectivement pour des protéines PR-2, PR-6 et PR-3. Cette induction présente un intérêt agronomique tout particulier puisqu'on peut la provoquer artificiellement chez les plantes et par la suite pourrait être un moyen de limiter les apports de pesticides dans les champs pour une agriculture durable plus respectueuse de l'environnement et de la santé humaine.

Mots clés : Actinomycètes PGPR, isolement, criblage, lutte biologique, *Botrytis cinerea*, *Vitis vinifera L.*, induction des défenses naturelles.

ABSTRACT

The aim of this study was to isolate PGPR Actinomycetes from wild healthy *Vitis vinifera* rhizosphere soil collected from several Moroccan regions in order to control *Vitis vinifera* grey mold agent *Botrytis cinerea* (*Bc*).

In the course of our screening program for (*Bc*) antagonistic actinomycetes, we selected 142 isolates from 4 different Moroccan regions (Errachidia, Skoura, Tinjadad , Tinghir). Twenty four isolates were selected for their antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Nine active isolates showing wide activity spectrum were screened for several PGPR capabilities. All 9 active isolates grow on *Vitis vinifera* root exudates. However, five only showed the antagonistic effect on this medium. They also produce the phytohormone-like compound of the IAA family, chitinases and siderophores making them very promising for plant growth stimulation (PGPB activity). The most powerful strains were then characterized on some physiological aspect (endophytic property, mineral phosphate solubilisation). The sequencing of the ARN 16S of these strains revealed that they are likely belonging to the genus *Streptomyces*

In the second part of this work, the fine taxonomic status of SS38, SS40 and SS10 strains was established using a polyphasic approach. Phylogenetic analysis based on the almost complete 16S rRNA gene sequence indicated that strain SS10 belongs to the Group I streptomycetes, branching off next to *Streptomyces marokkonensis* DSM 41918^T from the *Streptomyces violaceoruber* group. DNA-DNA relatedness and phenotypic data distinguished strain SS10^T from the phylogenetically closest related type strains. It is therefore proposed that strain SS10^T (CCMM b35^T = DSM 41919^T) represents the type strain of a novel *Streptomyces* species, for which the species name *Streptomyces thinghirensis* is proposed.

SS38 strain is retained for the following investigations: extraction, purification and chemical structures identification of its produced compounds.

In the last part of this thesis programme, among the six purified compounds five have been identified as potential ISR elicitors, for their ability to control systemically various diseases. The analysis of protein-encoding gene expression for *VvGluc*, *VvPR6* and *VvChi4C* in *Vitis vinifera* plantlet due to the investigated compounds has been monitored in sterile conditions. Results demonstrate that the SS38 strain compound is able to induce PR-2, PR-6 and PR-3. This study demonstrated that our selected Actinobacteria or their produced compounds could constitute a novel and non-polluting tools useful for the development of a sustainable biocontrol of *Vitis vinifera* grey mould agent.

Keywords: PGPR Actinomycetes, isolation, screening, identification, *Vitis vinifera*, biocontrol, *Botrytis cinerea*, grey mold.

INTRODUCTION

GENERALE

Les animaux ravageurs, les plantes parasites, les microorganismes pathogènes (bactéries, champignons, mycoplasmes, virus), les insectes et les nématodes sont responsables, chaque année, de la perte de 20 à 40% du rendement des cultures avant récolte (selon l'Organisation Mondiale de la Santé), et entre 1 et 20% après récolte (Wojcieh et Lise, 2002), 70 % des dommages étant d'origine fongique.

Botrytis cinerea est l'un des champignons phytopatogènes les plus répandu mondialement. Il a la particularité d'être polyphage et ainsi de s'attaquer à diverses plantes (on le retrouve sur environ 200 plantes cultivées ou sauvages) dès que les conditions climatiques lui sont favorables (Elad *et al.*, 2004). Il est capable de se développer aussi bien en saprophyte sur des débris végétaux, qu'en parasite aux dépends d'une plante vivante. La pourriture grise due à ce champignon est économiquement importante car elle détruit chaque année une partie des récoltes viticoles et horticoles (fraises, concombres, tomates,...).

Chez la vigne, *B. cinerea* peut être à l'origine de la pourriture noble sur de rares terroirs, ce qui permet d'obtenir des vins plus liquoreux (Sauternes, Coteaux du Layon, Monbazillac). Dans d'autres régions en revanche, il est responsable de la pourriture grise (Pezet *et al.*, 2004). C'est notamment le cas où cette maladie provoque des pertes de récoltes autant quantitatives que qualitatives (Pezet *et al.*, 2004). Dans les dernières années, des pertes de rendement allant jusqu'à 40% ont été ainsi constatées en Champagne (Viniflor, données 2006). De plus, il a été montré que la pourriture grise est à l'origine de conséquences graves sur la qualité des vins. Elle provoque ainsi une diminution de la moussabilité en même temps qu'une altération de leurs qualités organoleptiques (Marchal *et al.*, 2002). Il apparaît, de ce fait, important de combattre la pourriture grise.

Plusieurs méthodes de lutte ont été envisagées pour combattre ce champignon. Cependant, malgré les traitements pour l'éliminer, il est difficile d'éradiquer totalement les dégâts causés par sa présence. La lutte chimique est actuellement en vigueur, ce sont essentiellement des pesticides de synthèse qui sont utilisés. Ces produits chimiques sont considérés comme l'arme la plus efficace, mais ces substances ont des conséquences néfastes (Kouassi, 2001; Thakore, 2006) sur (1) l'environnement comme l'accumulation de résidus et la pollution des sols ; (2) le déséquilibre écologique, dû au fait que beaucoup de ces composés de synthèse ont un large spectre d'action, détruisant non seulement les agents nuisibles, mais également les autres populations de l'écosystème et ; (3) l'apparition et la généralisation des

mécanismes de résistance chez les pathogènes. Ce phénomène, qualifié de MDR (MultiDrug Resistance) est en progression et il résulte d'une excrétion cellulaire accrue de fongicides appartenant à plusieurs familles chimiques et non d'une mutation spécifique du gène codant pour la cible du fongicide.

Au regard de ces inconvénients, il est important de trouver des solutions alternatives qui permettront de continuer à lutter contre les phytopathogènes tout en diminuant l'emploi de produits chimiques. Celles-ci peuvent faire appel à la rationalisation des pratiques agricoles (fumigation-stérilisation en horticulture, désinfection des graines, rotation des cultures, contrôle du vecteur de la maladie...), à l'utilisation de variétés végétales résistantes (croisements sélectifs, insertion de gènes...) ou au développement des biopesticides.

Ces biopesticides ou agents de lutte biologique, peuvent être définis comme des produits phytosanitaires dont le principe actif est un organisme vivant ou l'un de ses dérivés. Ils peuvent donc être constitués d'organismes (plantes, insectes, nématodes) ou de micro-organismes (bactéries, levures, champignons, virus) exerçant une activité protectrice sur les plantes vis-à-vis d'agents phytopathogènes. Ils peuvent aussi être des substances d'origine naturelle telles que des extraits végétaux, phéromones, etc. (Thakore, 2006). Tout comme les autres agents de lutte biologique, les biopesticides microbiens sont écologiquement beaucoup plus compatibles que les produits chimiques et ont une spécificité accrue vis-à-vis des pathogènes contre lesquels ils sont dirigés. Ils sont par conséquent moins dommageables pour les organismes non ciblés de la microflore endogène qui exerce une action bénéfique sur les plantes. De plus, les biopesticides 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. En outre, ils peuvent être complémentaires au traitement chimiques (Fravel, 2005 ; Lee *et al.*, 2006 ; Lourenco Junior *et al.*, 2006 ; Minuto *et al.*, 2006 ; Thakore, 2006 ; Saravanakumar *et al.*, 2007). Parmi les biopesticides microbiens, les produits à base de bactéries représentent 74% du marché mondial (Figure 1).

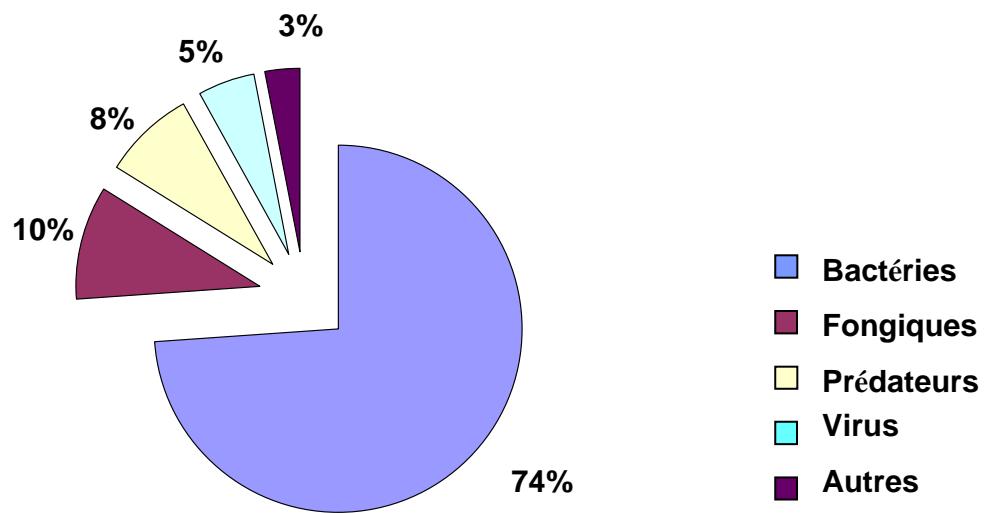


Figure 1: Le marché des biopesticides microbiens en 2005 (Thakore, 2006).

Parmi ces bactéries, les Actinomycètes représentent une partie importante de la population microbienne du sol où ils sont trouvés, de la surface jusqu'à plus de deux mètres de profondeur (Breton *et al.*, 1989). Ils sont capables de coloniser la rhizosphère grâce à leurs caractères antagonistes et compétitifs vis-à-vis des autres micro-organismes du sol, de produire de nombreux métabolites ayant des structures chimiques et des activités biologiques très diverses (Ouhdouch *et al.*, 2001 ; Cao *et al.*, 2005 ; Gundliffe, 2006 ; Sontag *et al.*, 2006). Grâce à ces aptitudes, ces microorganismes sont largement utilisés dans la lutte biologique contre les phytopathogènes du sol (Xiao *et al.*, 2002; Shih *et al.*, 2003 ; Jain et Jain, 2007 ; Lehr *et al.*, 2008). L'interaction entre la plante et ces microorganismes peut avoir des effets positifs sur la santé des plantes, la récolte et la qualité du sol (Sturz et Christie, 2003 ; Welbaum *et al.*, 2004 ; El-Tarabily *et al.*, 2006). De ce fait, de nombreux chercheurs portent un intérêt croissant aux actinomycètes et certains pays en ont fait un des axes prioritaires de leurs programmes de recherche en biotechnologie.

Le travail que nous proposons dans le cadre de la présente thèse vise à contribuer à la caractérisation de souches d'actinomycètes d'origine marocaine antagonistes productrices d'antifongiques actifs vis-à-vis des agents phytopathogènes de la vigne et en particulier *Botrytis cinerea* (agent causal de la pourriture grise). Cette étude a également pour objectif la stimulation des mécanismes de défenses naturelles de la vigne contre *B. cinerea* et la caractérisation des mécanismes de ces défenses. Elle contribuera également à une meilleure compréhension des mécanismes d'induction des phénomènes de résistance de la vigne et des moyens employés par les pathogènes pour attaquer et envahir les tissus végétaux.

Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons tout d'abord procédé au criblage et à la sélection des souches d'actinomycètes antagonistes productrices d'antifongiques actifs vis-à-vis de *Botrytis cinerea*. L'étude des mécanismes de la lutte biologique par analyse des changements histologiques, cytologiques, physiologiques et biochimiques en relation avec l'acquisition de la résistance de la plante traitée par les antagonistes après une attaque par ce pathogène ainsi la caractérisation moléculaire des gènes impliqués dans l'induction de la résistance chez la plante traitée par les souches d'actinomycètes antagonistes et/ou les molécules actives.

Par ailleurs, nous avons procédé à l'identification moléculaire des souches d'actinomycètes antagonistes sélectionnées par séquençage des gènes de l'ARN 16S et par la technique d'hybridation ADN-ADN. L'étude de certains aspects de la physiologie des souches d'actinomycètes a également été faite afin d'optimiser les conditions d'extraction, de purification et par la suite l'élucidation structurale des molécules d'intérêt élaborées et par la suite nous avons étudié les activités (antifongique, protection, élicitation des mécanismes de défenses,...), les doses et le temps nécessaires pour protéger les plantes de la vigne *in vitro* et *in vivo* (vitroplantules dans la gélose, dans le sol stérile et en serre). Enfin, une étude de la validité du modèle de lutte biologique sélectionné pour l'application en parcelle.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1- La vigne (*Vitis vinifera*)

1.1. Présentation générale du développement de la vigne

La vigne, plante pérenne, a un fonctionnement différent de celui des plantes annuelles et comparable à celui des arbres fruitiers. Originellement capable de vivre entre 60 et 100 ans, sa domestication, et en particulier le greffage (Figure 2), ont réduit sa durée de vie au vignoble à 30-50 ans (les pieds de vigne sont généralement arrachés après cette période). La vigne n'est généralement productive qu'au bout de 3, voire 4 ans après la plantation. Elle doit simultanément accumuler des réserves pour la récolte de l'année suivante et alimenter les grappes de l'année en cours. La récolte d'une année est ainsi l'aboutissement d'un cycle de 2 ans. Lors de la première année (n) la vigne stocke des réserves et forme des ébauches de grappes dans des bourgeons dits latents. Au printemps de l'année suivante (n+1), les ébauches donnent des inflorescences qui produisent des grappes après fécondation (Mullins *et al.*, 1992).

1.1.1. Présentation botanique

La vigne, plante angiosperme dicotylédone est une liane de la famille des *Vitaceae*, autrefois famille des *Ampelideae* (Planchon, 1887). Cette famille, associée aux familles des *Rhamnaceae* et des *Leeaceae*, forme l'ordre des Rhamnales (Chadefaud et Emberger, 1960). Les *Vitaceae* sont, pour la plupart, des plantes ligneuses ou herbacées, ainsi que des arbustes à tiges sarmenteuses (Hellman, 2003).

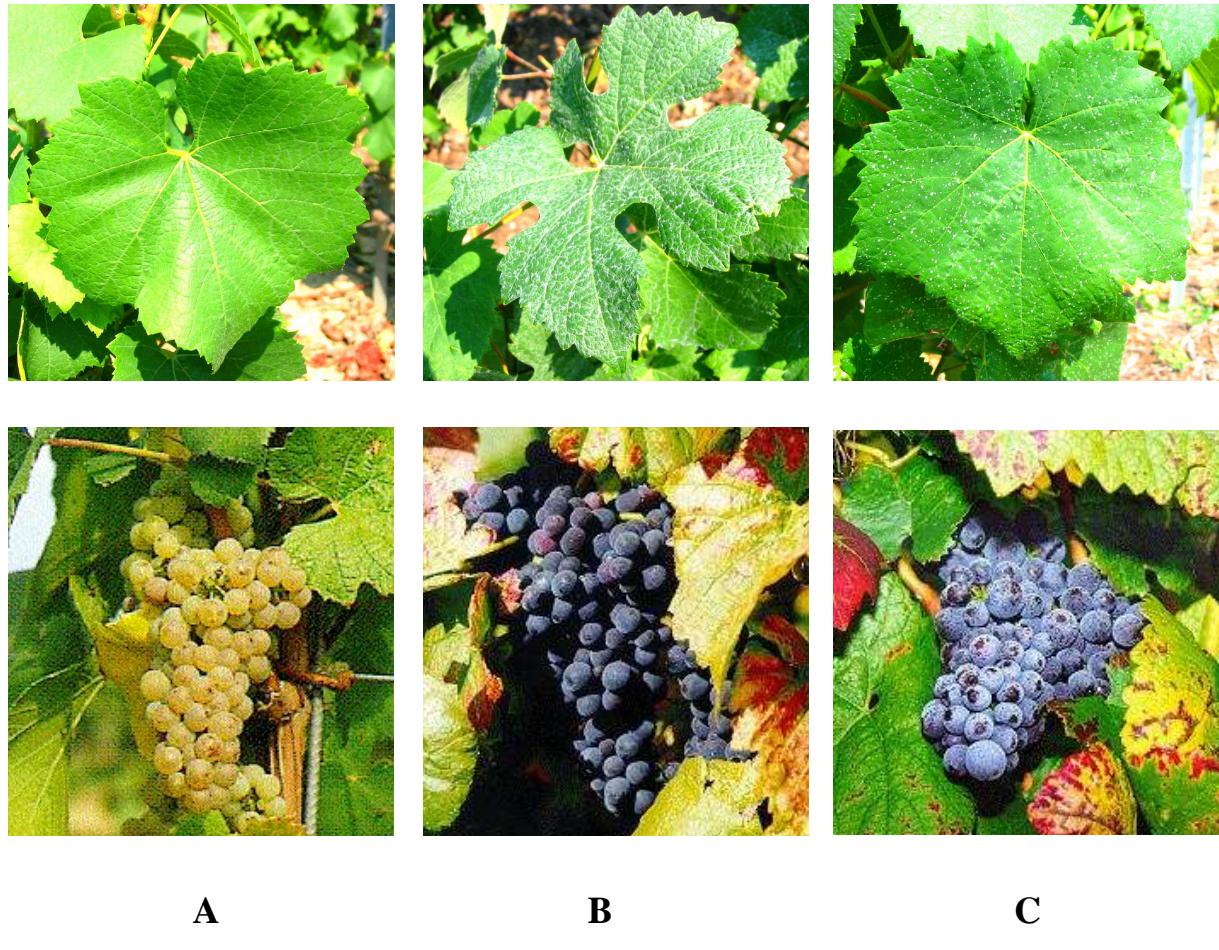


Figure 2 : Principaux cépages greffés cultivés dans la région champenoise avec en haut la morphologie caractéristique des feuilles et en bas celle des baies matures. A) Chardonnay, B) Pinot Meunier et C) Pinot noir Reynier (1989).

1.1.2. Cycle de développement

Le développement de la vigne est une succession de cycles annuels où les bourgeons jouent un rôle primordial car ils peuvent se développer selon un cycle végétatif (Figure 3) en donnant naissance à un rameau feuillé ou selon un cycle reproducteur en donnant des inflorescences puis des grappes. La vigne doit donc assurer d'une part la croissance et le développement des organes végétatifs (rameaux, feuilles, vrilles, racines) qui ont un rôle de gestion des réserves et de photosynthèse, et d'autre part le développement des organes reproducteurs et des fruits (Huglin et Schneider, 2003).

En fin d'hiver, lorsque la température du sol s'élève, le système racinaire s'active en stimulant l'absorption d'eau et en mobilisant les réserves accumulées lors de la campagne précédente. En absence de végétation, la montée de sève ou poussée racinaire s'observe par des suintements au niveau des plaies de taille connus sous l'appellation de pleurs.

Vers la mi-avril, les bourgeons protégés en hiver par des écailles brunâtres commencent à gonfler en écartant ces écailles protectrices. Ce phénomène, appelé débourrement, correspond au départ du cycle de développement de la vigne. En 1952, Baggioini a décomposé le développement annuel de ces organes en 16 stades phénologiques (Figure 4). La tendance fut ensuite d'affiner cette description en subdivisant les stades existants. Ceci fut notamment l'objet de la description de Meyer en 2001 dans l'échelle BBCH.

Dans cette échelle BBCH, il est décrit qu'après l'étalement des premières feuilles (stades 11 à 13), les inflorescences apparaissent (stade 53), puis se séparent grâce à l'allongement des entre-noeuds (stade 55). Ensuite, les boutons floraux se séparent (stade 57) et les pédicelles des fleurs s'allongent, ce qui permet de différencier chaque fleur lors de la floraison (stades 60 à 69). L'ovaire est ensuite fécondé et devient fruit, ce qui correspond à la nouaison (stade 71). Puis, les fruits se développent et passent progressivement aux stades de plomb de chasse (stade 73), de petit pois (stade 75) avant que les grappes pendent sous le poids des baies. Les fruits grossissent ensuite et finissent par se toucher, ce qui induit la fermeture de la grappe (stades 77 à 79). Enfin, au cours de la maturation, les baies commencent à s'éclaircir et à changer de couleur (stade 81) et à la véraison, les baies deviennent molles au toucher (stade 85) puis mûrissent jusqu'à la vendange (stade 89).

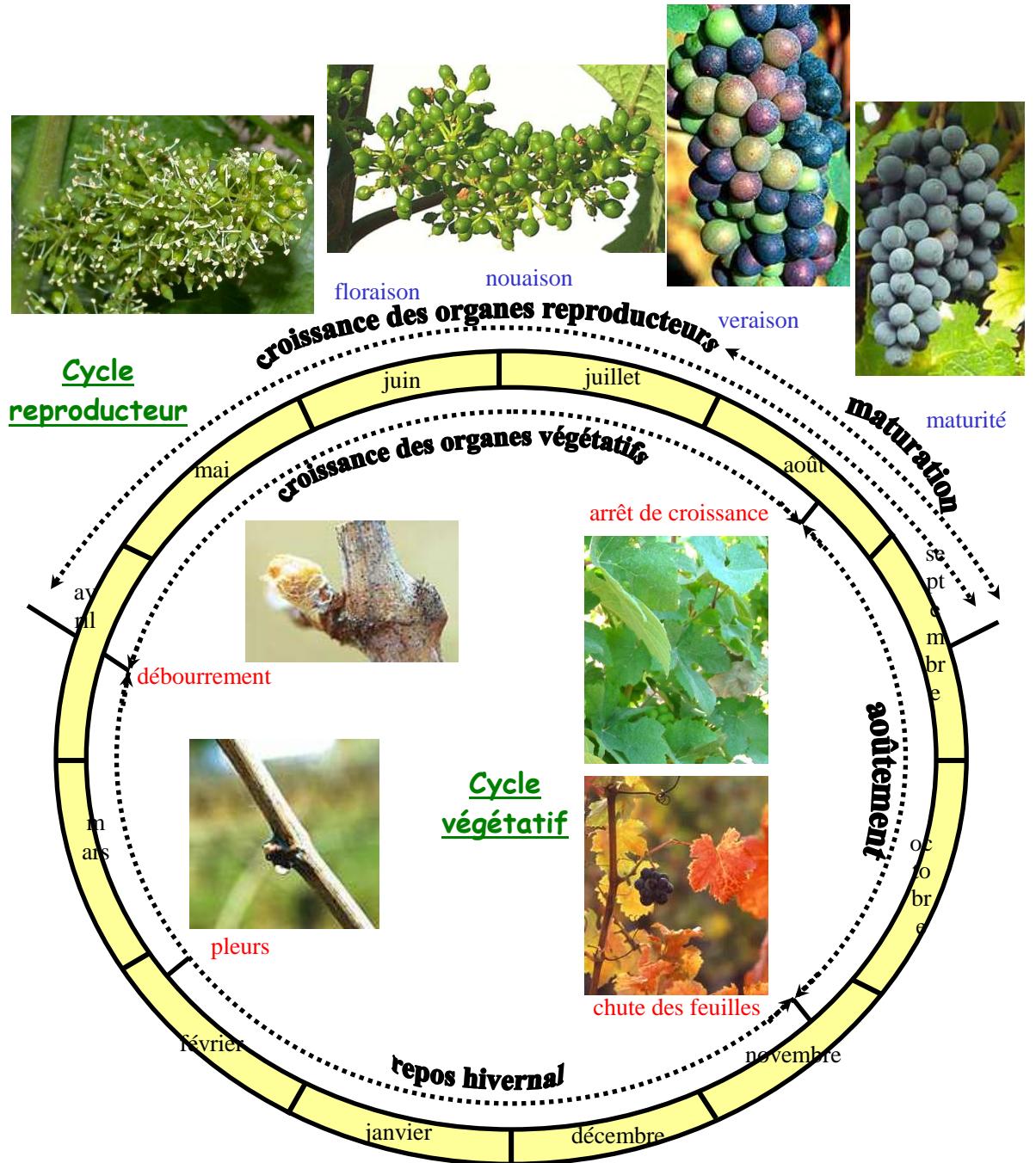


Figure 3: Cycle de développement de la vigne d'après Reynier (1989).

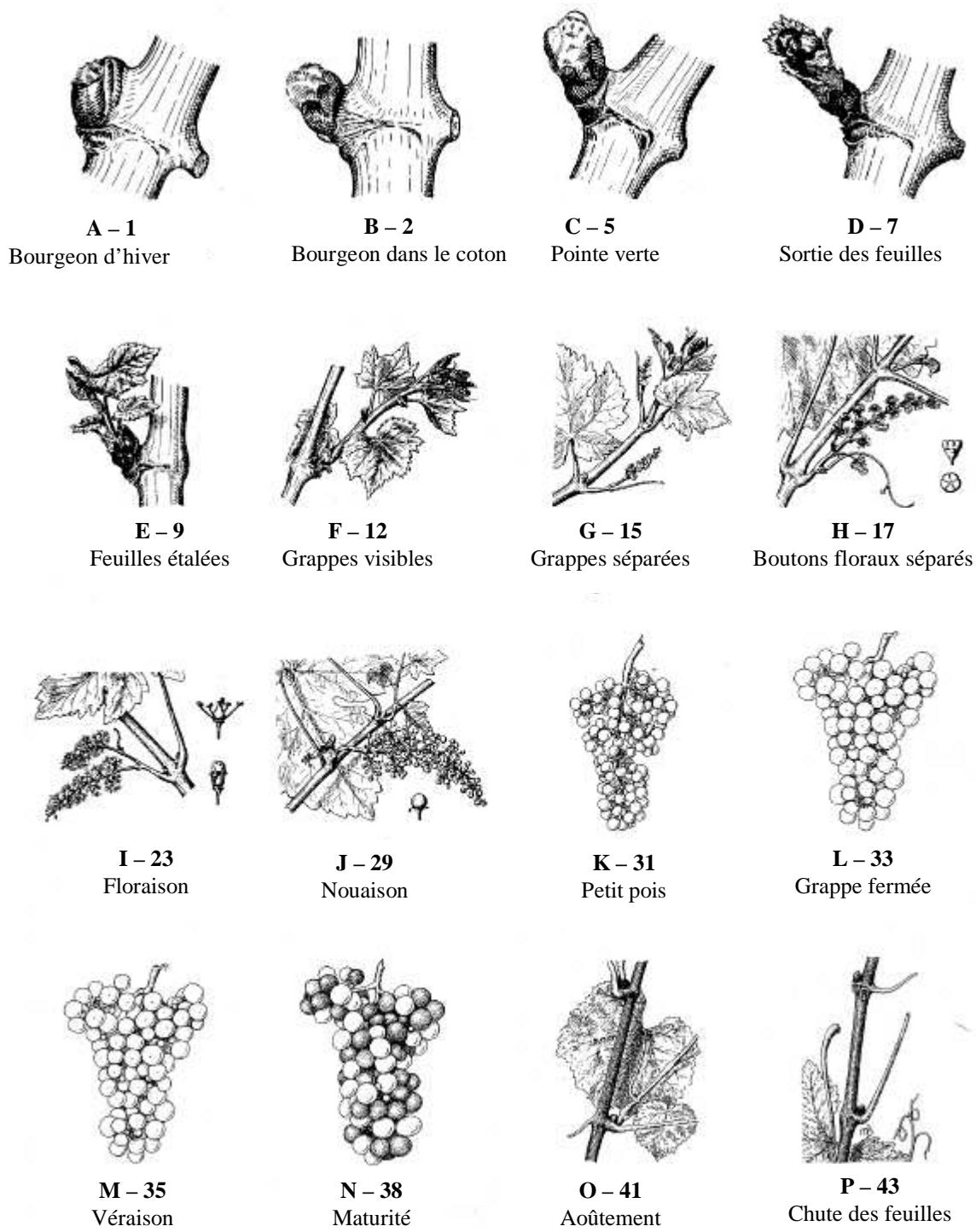


Figure 4: Stades repères de la vigne selon la classification de Baggioini (1952) pour les lettres et selon Eichhorn & Lorenz (1977) pour les chiffres.

1.2. La vigne et ses pathogènes

La vigne, comme toutes les plantes est soumise à de nombreuses contraintes biotiques comme le développement de plantes adventices, qui entrent en compétition avec la vigne en puisant les éléments minéraux du sol, de champignons phytopathogènes à l'origine de nombreuses maladies. Nous pouvons citer ainsi, *Plasmopara viticola* agent responsable du mildiou, *Erysiphe necator* de l'oïdium, *Eutypa lata* de l'eutypiose, *Botryosphaeria* sp. “black dead arm” et divers champignons (*Phaemonacremonium* sp., *Phaemoniella* sp. *Phellinus* sp...), des maladies du bois ou ESCA (Galet, 1977 ; Huglin et Schneider, 2003). La vigne peut être aussi attaquée par des virus tels que (GFLV pour “Grapevine fanleaf virus” responsable du court-noué, *Closterovirus* sp. Responsable de l'enroulement), des phytoplasmes (flavescence doré causée par des microorganismes de type mycoplasmes), des insectes (charançon, pyrale, ver de la grappe, cochenilles, cicadelles) ou des bactéries (nécrose bactérienne due à *Xylophylus ampelinus*, galle du collet avec *Agrobacterium vitis*, maladie de Pierce avec *Xylella fastidiosa* (Galet, 1977 ; Huglin et Schneider, 2003).

Le champignon *Botrytis cinerea*, à l'origine de la pourriture grise du raisin, représente également une contrainte considérable au sein du vignoble dans le monde, par les pertes de rendement et la diminution de la qualité organoleptique des vins qu'il peut occasionner.

2- *Botrytis cinerea* agent de la pourriture grise de la vigne

2.1. Classification

Botrytis cinerea Pers. :Fr. (*Botryotinia fuckeliana*) est un Deutéromycète, ordre des Moniliales, famille des Moniliacées (Giraud, 1988). *B. cinerea* est la forme conidienne (asexuée) de ce champignon alors que *Botryotinia fuckeliana* (de Bary, 1879) Whetzel est la forme parfaite (télomorphe), sexuée, initialement classée chez les Ascomycètes, ordre des Héliotiales, famille des Sclerotiniacées (Korf, 1973).

2.2. Cycle biologique

Botrytis cinerea est un champignon nécrotrophe mondialement répandu. Il a la particularité d'être polyphage et ainsi s'attaquer à diverses plantes dès que les conditions climatiques lui sont favorables (Elad *et al.*, 2004).

Généralement, ce champignon existe sous quatre formes selon son cycle biologique (Figure 5) : sclérotes, mycélium, conidies et apothécies. Il passe l'hiver sur les débris végétaux et sur le sol sous forme de mycélium ou d'organes de résistance (sclérotes) (Galet, 1977 ; Coley-Smith *et al.*, 1980). Les sclérotes, dans des conditions particulières, développent des apothécies qui donnent des ascospores. Ces apothécies sont rarement observables mais constituent aussi une forme de dissémination du champignon. Le plus souvent, les sclérotes germent au cours du printemps, forment d'importantes masses de mycélium qui produisent des spores dispersées ensuite par le vent. Dans des conditions d'humidité importante, ces spores peuvent germer et pénétrer la plante hôte directement ou, le plus souvent au niveau des tissus endommagés. Dans les baies de raisin, le champignon demeure latent jusqu'à la véraison (McClellan et Hewitt, 1973 ; Verhoeff, 1980 ; Pezet et Pont, 1984 et 1986). Au cours de la maturation, des phénomènes de sénescence inhérents à tout fruit interviennent et facilitent l'infection par *B. cinerea* (Elad, 2004). En effet, le contenu en sucre des baies augmente, celui en acides et en composés antimicrobiens diminue à un niveau acceptable pour la croissance du champignon (McClellan et Hewitt, 1973, Hill *et al.*, 1981). Le mycélium âgé peut aussi entreprendre un cycle asexué en produisant des macroconidies à partir de phyalides, elles peuvent ensuite germer pour redonner du mycélium (Dubos, 1999). Le mycélium peut aussi rester sous forme stérile et former une toile.

Dans des conditions d'humidité relative élevée, le champignon sporule et infecte les substrats végétaux ou sérieusement affaiblis, puis il se propage aux tissus sains (Mansfield, 2000). La maladie se manifeste par des zones de nécrose avec croissance fongique d'où son nom 'pourriture grise'. Elle atteint aussi bien les feuilles, les bourgeons, les jeunes pousses, les fleurs et les fruits. Elle est responsable d'importantes pertes économiques liées aux dégâts engendrés en pré- comme en post-récoltes sur les différentes cultures d'intérêt agronomique touchées.

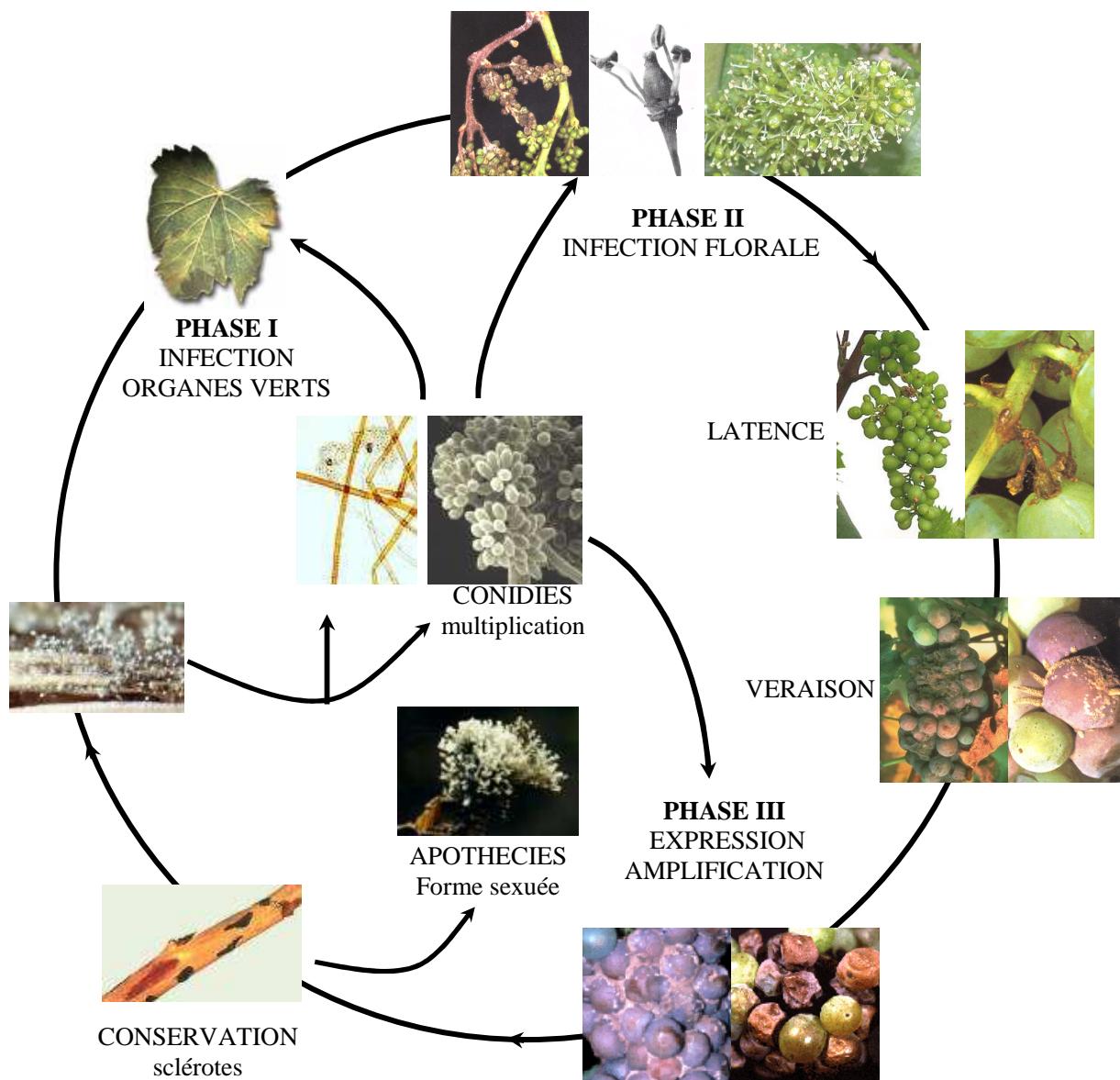


Figure 5 : Cycle d'infection de *Botrytis cinerea* chez la vigne d'après Perret (2001).

2.3. L'infection de la plante par *B.cinerea*

Chez la vigne, *B. cinerea* peut infecter tous les organes de la plante après sa pénétration *via* des blessures, les stomates en présence des conditions d'humidité relativement élevée ou par des enzymes de virulence (chitinases, polygalacturonases, laccases, xylanases,...). Cependant, dans des conditions d'humidité élevée, la pénétration peut aussi se faire directement *via* le mycélium. Dans un premier temps, il croît de façon limitée au niveau des étamines déhiscentes ou d'autres débris végétaux localisés entre les baies et peut infecter directement les fruits à son contact (Elad *et al.*, 2004 ; Pezet *et al.*, 2004).. Le mycélium peut aussi pénétrer *via* le style dans le fruit en développement.

Ce champignon peut ainsi être détecté sur les feuilles, sur la tige, bourgeons préfloraux, les fleurs et les baies (Figure 6). Les conséquences de son infection sont cependant plus importantes au niveau des fleurs et des baies. L'infection des fleurs est même considérée comme une étape importante dans le développement de la pourriture grise au niveau des fruits. *B. cinerea* peut ainsi infecter divers organes floraux, puis entrer en phase de latence pour se développer ensuite au moment de la maturité des baies (Keller *et al.*, 2003). Martinez *et al.*, (2005) ont démontré, néanmoins, que différents groupes de populations de *B. cinerea* peuvent être à l'origine de l'infection de ces organes. Le groupe I et le groupe II (*vacuma*) sont ainsi trouvés principalement au niveau des fleurs, tandis que le groupe III (*taransposa*) domine au niveau des fruits. Cependant, l'infection des fleurs peut expliquer de nos jours jusqu'à 78% de la pourriture grise identifiée au niveau des baies (Nair *et al.*, 1995). A la floraison, les déchets floraux (étamines déhiscentes, capuchons floraux), le réceptacle floral, le stigma et l'ovaire offrent ainsi un support pour le champignon qui peut y établir un inoculum primaire (Wolf *et al.*, 1997 ; Keller *et al.*, 2003 ; Viret *et al.*, 2004). Puis à la maturité des baies, les fruits présentent des défenses contre ce pathogène (Jeandet *et al.*, 1991 ; Bais *et al.*, 2000).

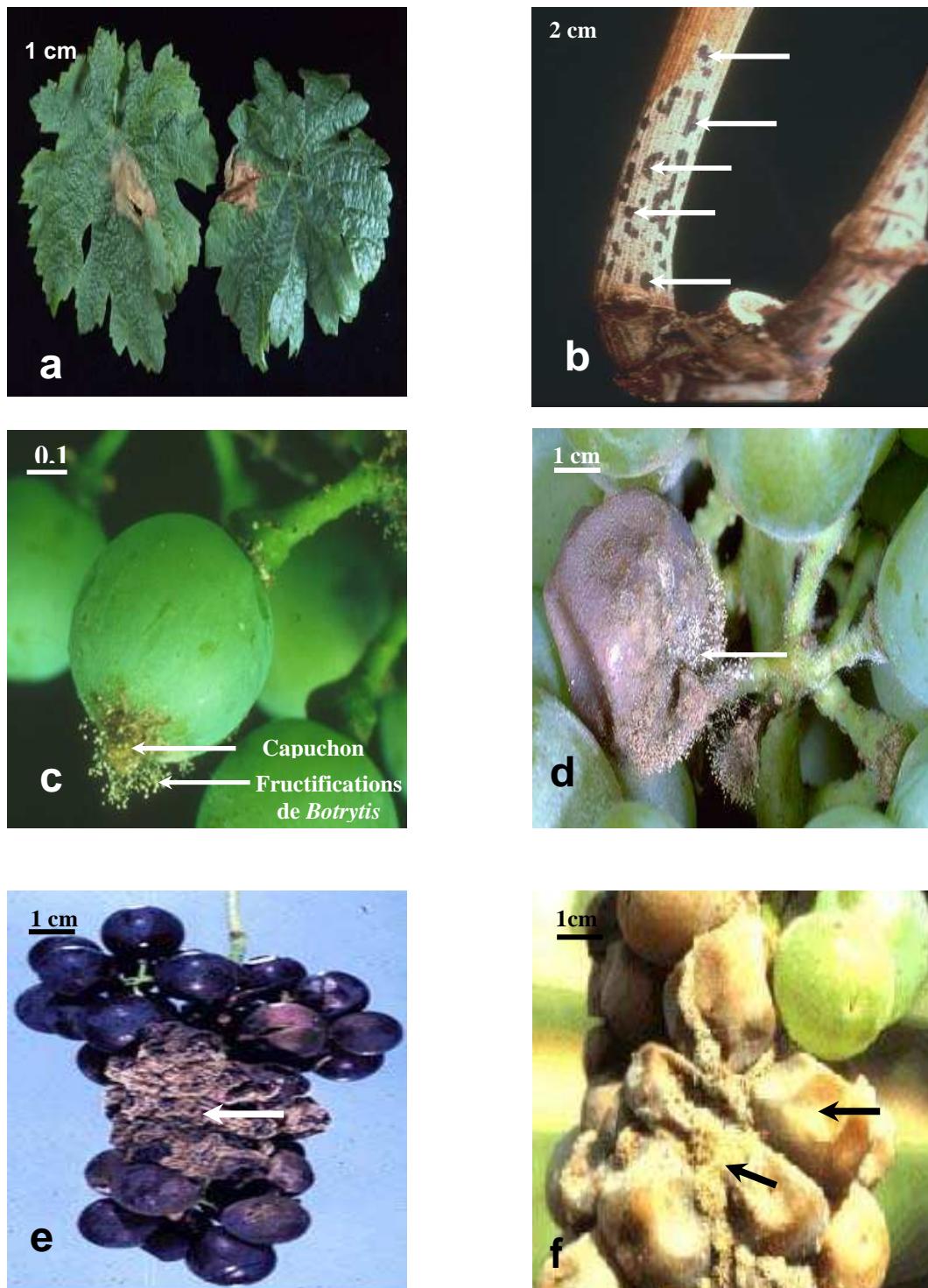


Figure 6 : Symptômes de *Botrytis cinerea* sur des organes végétatifs de la vigne. (a) au niveau foliaire, (b) au niveau caulinaire, (c) sur capuchon floral en fin de floraison, (d) sur baie au stade véraison, (e) sur baie en maturation et (f) formation de spores permettant de nouvelles infections (Bugaret, 2002 ; Clark, 2002).

3. La résistance naturelle des plantes

Au cours de leurs évolutions, les plantes ont toujours pu se protéger contre les agents pathogènes grâce à un système de défense complexe impliquant des défenses constitutives et/ou induites suite à leurs interactions avec les agents pathogènes (Jones et Dangl, 2006).

Les défenses préformées ou constitutives, peuvent ainsi se retrouver au niveau de chaque partie de la plante (racines, tige, feuilles..) et sont constituées par des barrières physiques (l'écorce, l'épiderme, cuticule..) et chimiques (toxines et exsudats antimicrobiens) (Wittstock et Gershenson, 2002). Ce type de défense permet de restreindre l'infection par certains microorganismes. Cependant, il peut être contourné par d'autres microorganismes tels que ceux à l'origine des maladies parasitaires (Ton *et al.*, 2006).

Les défenses induites peuvent se mettre en place suite à l'interaction entre la plante et un agent pathogène (Jones et Dangl, 2006). Ce type de défense est la conséquence d'une reconnaissance de l'agent pathogène par la plante.

3.1. Reconnaissance de l'agent pathogène

Lors de l'attaque d'une plante par un pathogène, une reconnaissance race/cultivar peut avoir lieu et implique un système particulier : l'interaction décrite par Flor en 1947. C'est le système gène-pour-gène, ce système implique un gène dit d'avirulence (*avr*) chez le pathogène et un gène dit de résistance (*R*) chez la plante. Quand, au cours de l'interaction, il y a présence du gène *R* et du gène *Avr* correspondant, l'interaction est incompatible. Le pathogène est alors incapable d'induire la maladie et la plante résiste. Dans tout autre cas, l'interaction est compatible, la plante est sensible et il y a maladie (van der Hoorn *et al.*, 2002).

Cependant, le système *Avr-R* ne fonctionne pas dans tous les cas et un modèle de garde a été établi. Selon cette hypothèse, le produit du gène *R* est une protéine de garde qui reconnaît la cible de virulence modifiée par le produit du gène *Avr* et participe ensuite à l'activation des réactions de défense (Dangl et Jones, 2001 ; Mackey *et al.*, 2002 ; van der Hoorn *et al.*, 2002).

La reconnaissance de l'agent pathogène par la plante peut également provenir *via* la perception par la plante de molécules appelées éliciteurs ou PAMPs “Pathogen-Associated Molecular Pattern” ou MAMPs “Microbial-Associated Molecular Pattern” (Nürnberger et Brunner, 2002 ; Parker, 2003 ; Jones et Dangl, 2006). Ces éliciteurs sont systématiquement associés à la présence et/ou à l'activité de l'agent pathogène au contact des tissus de la plante. Les éliciteurs peuvent être sécrétés par le microorganisme pathogène, dans ce cas ils sont qualifiés d'exogènes. Ils peuvent aussi être produits par la plante du fait de l'activité d'enzymes hydrolytiques sécrétées par l'agent pathogène et ils sont dans ce cas qualifiés d'éliciteurs endogènes. La nature des éliciteurs est très diverse : les plus fréquents sont les oligosaccharides, les lipides, les polypeptides, les glycoprotéines et les acides (Bouizgarne *et al.*, 2006, Samadi et Behboodi, 2006).

3.2. Réponses cellulaires

Après la reconnaissance de l'agent pathogène par la plante, des réactions rapides de transduction du signal se mettent en place dans les cellules agressées. Ceci intervient tout d'abord au niveau intracellulaire puis ensuite au niveau intercellulaire (Garcia-Brunner *et al.*, 2006 ; Kachroo, 2007).

Dans le cas de la transduction intracellulaire, des modifications de la perméabilité de la membrane plasmique prennent place suite à l'infection. Celles-ci se traduisent le plus fréquemment par une dépolarisation membranaire associée à des flux d'ions (influx de Ca^{2+} , efflux de K^+ , Cl^-), des activations de protéines Kinases et de phosphatases, la production des formes actives de l'oxygène (FAO), l'oxyde nitrique ainsi qu'une oxydation lipidique. Ces évènements ont notamment été décrits lors de l'interaction entre le tabac et la cryptogéine, un PAMP sécrété par le champignon du genre *Phytophtora* sp. (Garcia-Brunner *et al.*, 2006), ou entre la vigne et l'éliciteur BcPG1 issu de *B. cinerea* (Poinssot *et al.*, 2003 ; Vandelle *et al.*, 2006).

La production des FAO est intéressante car elle intervient lors du développement de la plante comme dans le cas de la croissance cellulaire (Foreman *et al.*, 2003) ou de l'elongation racinaire (revue Torres et Dangl, 2005) mais également lors de l'interaction entre la plante et un agresseur (Mitller *et al.*, 2004), ou lors d'un contact entre la plante et des microorganismes bénéfiques (Gerber *et al.*, 2004).

Les FAO sont essentiellement représentées par l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroperoxyde (HO_2^\cdot), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , la forme la plus stable) et enfin le radical hydroxyde (OH^\cdot). Lors de l'interaction entre la plante et son environnement biotique, ces composés oxygénés vont s'accumuler pour former un “brust oxydatif” (Mitller *et al.*, 2004). Ceci peut être à l'origine d'autres réactions de défense de la plante (Mellersch *et al.*, 2002). Ainsi, les FAO sont impliquées dans le renforcement des parois cellulaires (Brisson *et al.*, 1994), la mise en place de la réponse phypersensible (Gechev et Hille, 2005) et contribuent à l'expression de gènes de défense (Grant et Loake, 2000), tout en étant potentiellement cytotoxiques vis-à-vis des microorganismes (Mehdy, 1994).

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule de signalisation importante chez les plantes et jouerait un rôle clef dans les interactions plantes/pathogènes en activant des gènes de défenses (Durner *et al.*, 1998 ; Delledonne *et al.*, 2001). Ce gaz originellement décrit chez les bactéries et chez l'animal peut également être produit par les plantes (Lamotte *et al.*, 2005). Il se trouve lors de l'elongation racinaire (Lamattina *et al.*, 2003 ; Stöhr et Stremlau, 2006), de la fermeture stomatique (Bright *et al.*, 2006), induit une réponse hypersensible (HR) tout particulièrement lorsqu'il est associé à la production des FAO (Clarke *et al.*, 2000 ; Delledonne *et al.*, 2001 ; Zaninotto *et al.*, 2006). Le NO intervient également lors de l'interaction entre un microorganisme pathogène et son hôte végétal (Wendehenne *et al.*, 2004 ; Mur *et al.*, 2006), ainsi que lors d'une association avec des microorganismes bénéfiques. Lors de l'interaction entre plante et un agent pathogène (ou ses PAMPs), le NO s'accumule et il est à l'origine d'un “brust nitrique” (Wendehenne *et al.*, 2004 ; Delledonne, 2005 ; Mur *et al.*, 2006, Zaninotto *et al.*, 2006). Ce gaz peut présenter divers rôles dans les interactions plantes/pathogènes. Il peut ainsi être cytotoxique vis-à-vis des microorganismes (Stamler *et al.*, 2001), être impliqué dans des cascades de signalisation (Lamotte *et al.*, 2005), contribuer aux renforcements pariétaux (Prats *et al.*, 2005) voire même induire l'expression de gènes de défense (Parani *et al.*, 2004).

3.3. Signalisation intercellulaire

Quatre types de molécules principalement semblent agir dans la transduction intercellulaire du signal pour induire une résistance au voisinage et à distance du site d'infection. Une signalisation *via* ces molécules “signales” se met en place dans toute la plante. Ceci permet aux différentes parties de la plante d'être informées de l'agression extérieure. Cette signalisation fait intervenir l'acide jasmonique (JA), l'acide salicylique (SA) et l'éthylène (ET) (Kachroo et Kachroo, 2007), bien qu'il y a également la systémine et l'acide abscissique (Mauch-Mani et Mauch, 2005). Ces molécules “signales” interviennent lors de divers mécanismes de défenses et sont même caractéristiques de certains phénomènes de résistance.

3.4. Les composés de défenses

Suite à l'infection de la plante par un agent pathogène, divers composés de défenses peuvent être synthétisés (van Loon *et al.*, 2006b). Des protéines PR ou “Pathogenesis-related” peuvent être produites par la plante lors de l'interaction avec un agent pathogène (Tuzun et Somanchi, 2006). Jusqu'à présent, dix-sept familles de protéines PR ont été répertoriées (Tableau 1). Celles-ci incluent des isoformes basiques ou acides qui présentent des activités différentes (van Loon *et al.*, 2006b).

Les fonctions de ces protéines PR n'ont pas encore été totalement identifiées, néanmoins, la majorité d'entre elles présentent des activités antimicrobiennes. Parmi ces familles, existent les PR-1 à fonction encore inconnue (Alexander *et al.*, 1993 ; Tahiri-Alaoui *et al.*, 1993 ; Niderman *et al.*, 1995), ainsi que les β -1,3-glucanases (PR-2), les chitinases (PR-3, PR-4, PR-8 et PR-11) capables de dégrader les parois fongiques (Tuzun et Somanchi, 2006). Parmi les protéines PR, on trouve également les PR-5, des osmotines qui perturbent la perméabilité membranaire des agents pathogènes (Vigers *et al.*, 1992 ; Hu et Reddy 1997), les PR-6, des inhibiteurs de protéases (Ryan, 1990 ; Larito *et al.*, 1994), ainsi que les PR-7, des endoprotéases qui seraient impliquées dans la dissolution des parois cellulaires microbiennes (van Loon *et al.*, 2006b). D'autres protéines PR existent également, c'est le cas pour les peroxydases ou PR-9 qui sont impliquées aussi bien dans le métabolisme de l'auxine et la biosynthèse de l'éthylène que dans la formation de la lignine (Lagrimini *et al.*, 1987).

Les PR-10, des N-glycosidases capables d'inhiber la synthèse protéique chez les microorganismes pathogènes (Stirpe *et al.*, 1992). A ces protéines PR, s'ajoutent également les défensines, les thionines et les LTP “Lipid Transfer Protein”, respectivement PR-12, PR-13 et PR-14 qui possèdent des activités antifongiques, parfois antibactériennes voire même insecticides (Wijaya *et al.*, 2000 ; van Loon *et al.*, 2006b). Chez les monocotylédones, des protéines PR-15 et PR-16 ont également été caractérisées. Elles sont à l'origine d' H_2O_2 cytotoxique pour les agents pathogènes et peuvent induire indirectement les réactions de défenses de la plante (Donaldson *et al.*, 2001 ; Hu *et al.*, 2003). Enfin, les PR-17 ont été récemment détectées chez le tabac, le blé et l'orge infectés par les agents pathogènes. Elles contiennent des séquences ressemblant aux sites actifs des métalloprotéinases (Christensen *et al.*, 2002) mais leurs fonctions n'ont pas encore été complètement caractérisées (van Loon *et al.*, 2006b).

En plus de ces protéines PR, d'autres molécules de défenses sont synthétisées lors de l'infection de la plante par un agent pathogène, ainsi des inhibiteurs de polygalacturonases (PGIP : polygalacturonase inhibitor protein) sont capables d'inactiver certaines enzymes microbiennes dégradant la paroi des cellules végétales (De Lorenzo *et al.*, 2001), les lipoxygénases (LOX) (Feussner et Wasternack, 2002), les phénylalaine ammonia-lyases (PAL) (Fukasawa-Akada *et al.*, 1999), les glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) (Esquerré-Tugayé *et al.*, 1999), les protéines également riches en glycine (Sachetto-Martins *et al.*, 2000). Des produits d'autres gènes sont sécrétés en réponse à l'infection de la plante par un agent pathogène (van Loon *et al.*, 2006b). La plupart de ces enzymes interviennent dans différents métabolismes secondaires et vont conduire à la production de différents composés qui, à leur tour, vont être impliqués dans les défenses de la plante. Des composés phénoliques issus du métabolisme secondaire tels que des terpénoïdes, des phénylpropanoïdes, des flavonoïdes, isoflavonoïdes et des tanins vont être ainsi sécrétés (Bennett et Wallsgrove, 1994 ; van Etten *et al.*, 1994 ; Hammerschmidt, 1999 ; Paiva, 2000). Ces molécules de faibles poids moléculaires peuvent former des barrières structurales ou sont toxiques sur les agents pathogènes, ce qui permet de restreindre leur progression (Seppänen *et al.*, 2004 ; Serazetdinova *et al.*, 2005 ; Jeandet *et al.*, 2007).

Tableau 1 : Les différents types de protéines PR d'après van Loon *et al.* (2006b).

Protéines PR	Membre type	Activité enzymatique	Cible
PR-1	Tabac PR-1a	Inconnue	Inconnue
PR-2	Tabac PR-2	β -1,3- glucanase	β -1,3-glucanes de la paroi
PR-3	Tabac P, Q	Chitinase de type I, II, III, IV, V, VI et VII	Chitine de la paroi
PR-4	Tabac R	Chitinase de type I, II	Chitine de la paroi
PR-5	Tabac S	Osmotine	Membrane cytoplasmique
PR-6	Tabac Inhibiteur I	Inhibiteur de protéinase	Protéinase
PR-7	Tomate P69	Endoprotéinase	Inconnue
PR-8	Concombre, chitinase	Chitinase de type VIII	Chitine de la paroi
PR-9	Tabac « lignin-forming peroxydase »	Peroxydase	Inconnue
PR-10	PR1 de persil	RNase	Inconnue
PR-11	Tabac chitinase de classe V	Chitinase de type I	Chitine de la paroi
PR-12	Radis Rs-AFP3	Défensine	Inconnue
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Thionine	Inconnue
PR-14	Orge LTP4	Protéine de transfert de lipides	Inconnue
PR-15	Orge OxOa (germine)	Oxalate oxydase	Membrane cytoplasmique
PR-16	Orge OxDLP	Oxalate oxydase-like	Membrane cytoplasmique
PR-17	Tabac PRp27	Inconnue	Inconnue

3.5. Les mécanismes de défenses

Différents mécanismes se mettent en place lors de l'infection de la plante par un agent agresseur (Jones et Dangl, 2006).

3.5.1. La réponse hypersensible ou HR

La réaction hypersensible (HR) est l'un des mécanismes de défense les plus fréquemment observés lors des interactions plante/pathogène (Watanabe et Lam, 2006). Il s'agit d'une mort cellulaire des tissus infectés par un agent avirulent. Cette mort cellulaire est communément considérée comme une forme de mort cellulaire programmée (PCD pour Programmed Cell Death) (Lam *et al.*, 2001, 2004).

En effet, la HR nécessite un métabolisme actif de la cellule végétale et dans certains cas, elle implique un synthèse protéique active (Nozue *et al.*, 1977 ; Heath, 2000 ; Xing *et al.*, 2001 ; Ren *et al.*, 2002), le renforcement des parois cellulaires ainsi que la production de composés antimicrobiens comme les phytoalexines (Hammond-Kosack et Jones, 1996 ; Ryals *et al.*, 1996). De plus, des tests pharmacologiques ont montré que la modification des flux ioniques (Atkinson *et al.*, 1996 ; Heath, 2000 ; Wendehenne *et al.*, 2004), la production des FAO, le NO et le SA sont essentiels pour l'activation et la mise en place de HR (Delledonne *et al.*, 2001 ; Torres *et al.*, 2002 ; Nawrath *et al.*, 2006).

3.5.2. La résistance locale acquise ou LAR

La résistance locale acquise ou LAR ‘‘Local Acquired Resistance’’ est un phénomène d'induction qui se met en place. La LAR est induite par les cellules en état de mort cellulaire *via* la transmission des molécules signals SA, JA et ET et se met en place autour de la zone où la HR s'est produite (Dorey *et al.*, 1998). C'est une zone typique où est accumulé et synthétisé un grand nombre de molécules antimicrobiennes tels que des composés phénoliques et des protéines PR. La résistance est très forte au niveau de cette zone, ce qui contribue à restreindre la progression des agents pathogènes (Cordelier *et al.*, 2003).

3.5.3. La résistance systémiques acquise SAR

La résistance systémique est un mécanisme de défense activé chez la plante par une première interaction avec un agent pathogène et qui lui confère une résistance durable (de l'ordre de quelques semaines) contre les infections provoquées par un large spectre de microorganismes pathogènes. Deux mécanismes de résistance systémique ont été mis en évidence à ce jour. Le premier et le plus décrit est la résistance systémique acquise (SAR pour Systemic Acquired Resistance) qui est induite suite à l'interaction de la plante avec des microorganismes avirulents (Dong, 2001). Le second est la résistance systémique induite (ISR pour Induced Systemic Resistance). Elle est activée suite à l'interaction entre la plante et des bactéries bénéfiques (Pieterse *et al.*, 1996 ; van Loon *et al.*, 1998 ; 2006b).

La SAR consiste en l'activation d'un certain nombre de gènes qui permettent l'induction et le maintien d'un état de résistance de la plante entière contre un large spectre d'agents pathogènes. Cette résistance dépend majoritairement de l'accumulation du SA aussi bien au niveau local qu'au niveau systémique (Métraux *et al.*, 2002 ; Nawrath *et al.*, 2003). A l'heure actuelle, il existe même une hypothèse selon laquelle un autre signal est transporté et induirait, à distance, une production de SA (Durrant et Dong, 2004).

3.6. Les défenses chez la vigne

Chez la vigne, comme chez les autres plantes, il n'existe aucun gène conférant une résistance complète contre *Botrytis* ce qui signifie qu'il n'existe pas de relation gène-pour-gène (Elad & Evensen, 1995). En revanche, des résistances partielles sont connues. Elles sont liées notamment à la structure de la cuticule, des barrières constitutives sont ainsi trouvées au niveau des feuilles, des baies et des racines (Hill *et al.*, 1981 ; Marois *et al.*, 1986 ; Percival *et al.*, 1993 ; Commenil *et al.*, 1997). Le nombre de couches cellulaires qui joue un rôle de protection (Sarig *et al.*, 1998), ainsi que la cire épidermique (Gagler *et al.*, 2003) et la densité des baies dans une grappe (Vail et Marois, 1991 ; Percival *et al.*, 1993) permettent ainsi de restreindre la progression des agents pathogènes.

La capacité de la vigne à induire un certain nombre de réponses de défense dépend de la virulence du pathogène (Staples & Mayer, 1995, Derckel *et al.*, 1999), de facteurs environnementaux qui influencent cette virulence mais aussi de l'âge de la plante (Reuveni, 1998) et de l'état de mûrissement des baies (Prudet *et al.*, 1992).

Différentes protéines PR ont également été identifiées chez la vigne et leurs gènes ont été séquencés. Depuis 1996, la littérature mentionne des glucanases (PR-2), des chitinases (PR-3), des osmotines (PR-5), des inhibiteurs de polygalacturonases (PR-6), des RNases (PR-10), des protéines de transfert des lipides (PR-14), et une PR-17 (Salzman *et al.*, 1998 ; Jacobs *et al.*, 1999 ; Bézier, 2003 ; Goes da Silva *et al.*, 2005). Des analyses sérologiques ont également permis de mettre en évidence une peroxydase (PR-9) et une PR-1 (Repka *et al.*, 2000 ; 2001 ; 2006). Parmi ces protéines ou leurs gènes associés, certains ont bien été étudiés, c'est le cas de *VvGluC* (codant pour une PR-2 basique) et *VvChi4C* (codant une PR-3 acide) ou de leurs protéines qui présentent de fortes activités antimicrobiennes (Derckel *et al.*, 1996 ; 1998 ; 1999 ; Bézier *et al.*, 2002 ; 2003 ; 2007). Une autre approche moléculaire par “Differential Display” a également permis d’identifier d’autres gènes codant des protéines PR ou des gènes régulés lors de l’infection de la vigne par *B. cinerea* (Bézier, 2003 ; Bézier *et al.*, 2007). Parmi ces gènes, on peut distinguer ceux nommés *Big* “*Botrytis*-induced grapevine gene” et *Brg* “*Botrytis*-repressed grapevine gene”. Certains d’entre eux ont permis d’identifier ou de ré- identifier *VvPR6*, *VvPR10* et *VvPR27* codent respectivement pour une PR-6, une PR-10 et une PR-17 (Bézier, 2003 ; Bézier *et al.*, 2007).

Chez la vigne, d’autres molécules de défenses ou leurs gènes ont été également identifiés comme par exemple PGIP “Polygalacturonase Inhibiting Proteins” ou des protéines inhibant la polygalacturonase, les Lipoxygénases, et les HRGP “Hydroxyproline Rich Glycoprotein” ou les glycoprotéines riches en hydroxyproline (Bézier, 2003 ; Bézier *et al.*, 2007). L’accumulation des composés phénoliques tels que des flavonoïdes, des tanins et des phytoalexines (les stilbènes trans- et cis-resvératol et ses produits d’oxydation α-, β-, γ-, δ- et ε-viniférine) est également retrouvée fréquemment chez la vigne, notamment suite à l’infection par un agent pathogène (Jeandet *et al.*, 1999 ; 2007).

Ainsi, différents mécanismes de défenses ont été caractérisés chez la vigne. Cependant, la caractérisation et la compréhension de ces mécanismes ne sont pas suffisants pour contrôler le développement de certains agents pathogènes comme c'est le cas pour *B. cinerea* (Pezet *et al.*, 2004), d'où la nécessité de trouver d'autres méthodes de lutte.

4. Les alternatives à la résistance naturelle des plantes

4.1. Les pratiques culturales

Les mesures prophylactiques visent à améliorer la vigueur de la vigne par un raisonnement, dès la mise en place de la vigne, par le choix d'un porte-greffe adapté et éventuellement celui du cépage et du clone. Sur une vigne en production, la vigueur peut se maîtriser par la diminution des apports (notamment azotés) et par l'enherbement permanent (spontané ou maîtrisé) : en fonction des possibilités techniques et de la diminution de vigueur recherchée, la largeur de la bande enherbée pourra être modulée. Bien aérer les grappes par une taille et un mode de palissage qui assurent une répartition homogène des grappes. L'ébourgeonnage, le rognage, l'effeuillage, et éventuellement l'éclaircissement permettent d'éviter l'entassement de la végétation. Ainsi, il faut limiter les blessures engendrées lors des opérations d'effeuillage en effectuant les réglages adéquats du matériel utilisé.

4.2. La lutte chimique

La lutte chimique contre les champignons phytopathogènes est largement utilisée et s'est révélée depuis toujours une méthode de lutte efficace et indispensable (Leroux, 2003 ; Pezet *et al.*, 2004). Les sites cibles des antifongiques dirigés contre *Botrytis* sont divers (Leroux *et al.*, 1999 ; Leroux, 2000).

La lutte est préventive et principalement assurée par l'application de fongicides au vignoble. Pour cette dernière, jusqu'à 78 300 tonnes de produits phytosanitaires ont été utilisés en France en 2005 (données UIPP, Union des Industries pour la Protection des Plantes). Ceci correspond à environ 50% des produits phytosanitaires utilisés. Cependant, l'apparition des effets secondaires de ces produits a remis en cause leur utilisation. En effet, des études ont montré que certains produits présentent une toxicité aigue ou chronique pour l'homme et les organismes non cibles (Leroux, 2004). De plus, les agents pathogènes peuvent devenir résistants à ces produits chimiques. Ceci a entraîné l'arrêt de certains fongicides

(Panon *et al.*, 2006). Depuis 2005, certains pays développés (USA, Union européenne, Canada) interdisent l'utilisation du bromure de méthyle comme fongicide chimique dans l'agriculture.

4.3. Les plantes transgéniques

Ce moyen de lutte alternatif envisage l'utilisation de plantes génétiquement modifiées permettant d'introduire une résistance à une ou plusieurs maladies en exprimant des gènes de défense issus d'autres organismes ou en sur-exprimant les gènes de défenses déjà existants (Cornelissen et Melchers, 1993 ; Shah, 1997 ; Punja, 2001 ; Gilbert *et al.*, 2006). La culture de certaines variétés de pommes de terre ou de courges résistantes aux virus, commercialisées par la société MONSANTO, est déjà autorisée aux Etats-Unis. Au niveau de la vigne, l'utilisation de la transgénèse a permis de conférer une protection contre différentes maladies (Kikkert, 1997 ; Yamamoto *et al.*, 2000 ; Coutos-Thévenot *et al.*, 2001 ; Legrand *et al.*, 2003 ; Ferreira *et al.*, 2004 ; Agüero *et al.*, 2005 ; Vidal *et al.*, 2006). Cependant, l'opinion publique européenne est globalement opposée à l'idée de " manger transgénique ", en absence de certitudes sur l'innocuité de la consommation de ces plantes pour l'homme. De plus, les effets délétères des produits chimiques et le manque d'efficacité des pratiques culturales ont nécessité la recherche d'une alternative durable par l'utilisation de la lutte biologique, non néfaste pour l'environnement.

4.4. La lutte biologique

La lutte biologique a pour principe d'utiliser des agents biologiques capables d'entrer en compétition (antagonisme) avec les agents pathogènes et les ravageurs sans avoir d'activité néfaste pour la plante. Ces agents naturels sont réunis sous le concept de biopesticides. La faune auxiliaire du vignoble (typhlodromes, coccinelles, chrysopes...) renferme des prédateurs naturels des parasites de la vigne d'où l'importance de la conserver en évitant l'emploi de substances chimiques trop agressives. Sa disparition pourrait, en effet engendrer un déséquilibre qui favorisera l'apparition ou la réapparition de certains pathogènes.

Plusieurs microorganismes du sol ont été utilisés pour lutter contre les maladies des plantes (Mao *et al.*, 1998 ; Emmert et Handelsman, 1999 ; Whipps, 2001 ; Singh *et al.*, 2003 ; Reyes *et al.*, 2004 ; Haas et Defago 2005 ; Valdebenito *et al.*, 2006 ; Rahman *et al.*, 2007). Ces microorganismes utilisent différents mécanismes pour lutter contre les agents phytopathogènes du sol, à savoir : L'antibiose, la compétition, le parasitisme et/ou l'induction des mécanismes de la résistance de la plante (Dunne *et al.*, 1996 ; Paulitz et Bélanger, 2001 ; Lugtenberg *et al.*, 2002 ; Spadaro et Gallino, 2004 ; Bouizgarne *et al.*, 2006 ; Prévost *et al.*, 2006 ; Lehr *et al.*, 2008).

Une meilleure application d'un agent efficace de la lutte biologique nécessite une bonne compréhension du ou / des mécanismes qu'il utilise et la ou / les molécules qu'il sécrète pour inhiber les agents phytopathogènes (Alabouvette *et al.*, 1993).

4.4.1. L'antibiose et la production d'antibiotique

L'antibiose par définition est l'inhibition de l'agent phytopathogène par la production des métabolites secondaires par un autre micro-organisme (Cook et Baker, 1983). En général ces métabolites sont des métabolites secondaires à faible poids moléculaire ayant une fonction antifongique et/ou antibactérienne. Ceux-ci offrent aux agents antagonistes un pouvoir d'inhibition des agents phytopathogènes et de colonisation de l'espace rhizosphérique des plantes (Peter *et al.*, 2003).

La production de ces métabolites présente un rôle important dans la lutte contre les maladies phytopathogènes (Cook et Baker, 1983 ; Fravel, 1988 ; Thomashow, 1996 ; Thomashow *et al.*, 1997 ; Schottel *et al.*, 2001 ; Raaijmakers *et al.*, 2002 ; Spadaro et Gallino, 2004 ; El-Tarably et Sivasithamparam, 2006). Cette production est influencée par des facteurs abiotiques qui correspondent à la composition du sol en matière organique (Lemrissé *et al.*, 2003), l'humidité du sol (Geotgakopoulous *et al.*, 1994) et le pH (Ownley *et al.*, 1992 ; Schoeman *et al.*, 1999). Les facteurs biotiques qui sont surtout liés à l'interaction de l'agent antagoniste avec la plante et la microflore du sol, peuvent aussi influencer la production d'antibiotique (Duffy et Defago, 1999 ; Lugtemberg *et al.*, 2002).

4.4.2. Compétition pour le fer et la production de sidérophores

Le manque de nutriments peut engendrer automatiquement la mort du pathogène. Ceci fait de la compétition nutritive un moyen important de la lutte biologique (Benitez *et al.*, 2004). Le fer est un élément essentiel pour la croissance et la survie de la plupart des champignons phytopathogènes (Eisemde *et al.*, 2004). Certains agents antagonistes ont la capacité de produire des composés de faibles poids moléculaires appelés sidérophores. Ces molécules permettent à ces microorganismes de chélater le fer du milieu et ainsi d'inhiber la croissance des agents phytopathogènes (Chet et Inbar, 1994 ; Thomashow, 1996 ; Bouitez *et al.*, 2004).

Outre la compétition nutritionnelle, la compétition spatiale contribue aussi à la réduction des infections racinaires par les agents phytopathogènes (Bouitez *et al.*, 2004). En effet, les microorganismes ayant la capacité de coloniser les racines comme certaines bactéries promotrices de la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) protègent les racines et occupent les sites d'infection aux agents phytopathogènes (Bouitez *et al.*, 2004 ; Compant *et al.*, 2005).

4.4.3. Parasitisme et production des enzymes

Le parasitisme consiste en l'interaction directe entre deux microorganismes où les tissus vivants de l'un constituent une base nutritive pour l'autre (Helluy et Holmes, 2005). L'agent antagoniste sécrète des enzymes dégradant les parois cellulaires des agents pathogènes comme les protéases, les chitinases et les glucanases. Les agents de biocontrôle qui utilisent ce mode sont nombreux. *Bacillus subtilis* réduit les populations de *Pythium ultimum* et *Rhizoctonia solani* par sécrétion de glucanases et de protéases (Paulitz et Bélanger, 2001). *Trichoderma* produit des β-glucanases dégradant les parois de *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* et *Pythium ultimum* (Tsahouridou and Tsahanassoulopoulos 2001, 2002 ; Viterbo *et al.*, 2002 ; Mukherjee *et al.*, 2003). Certains actinomycètes produisent aussi des chitinases et glucanases pour dégrader la paroi de *Fusarium oxysporum* (El-Tarably *et al.*, 1997 ; Sabaou *et al.*, 1998 ; Schottel *et al.*, 2001).

4.4.4. Promotion de la croissance de la plante et production des phytohormones

Les auxines, comme l'AIA pour (Acide Indole Acétique), qui peuvent être produites par des microorganismes, jouent un rôle important dans les interactions hôte-parasite et en particulier la régulation de la croissance des plantes (Hamill, 1993 ; Vassilev *et al.*, 2006a). Le mécanisme d'action de l'AIA a été expliqué par deux hypothèses: Selon Brown et Hamilton (1993), l'AIA peut agir en inhibant la germination des spores et la croissance mycéliale de différents champignons phytopathogènes où l'AIA avec les glutathion S-trasférases jouent un rôle dans les réactions de défenses de la plante (Hahn et Strittmatter, 1994 ; Droog, 1997). Morandi (1996) a rapporté que les mycorhizes peuvent entraîner une accumulation de phytoalexines, des flavonoïdes et des isoflavonides dans les racines des plantes ce qui provoque une lignification des endodermes, entraînant ainsi la résistance des plantes mycorhizées aux attaques des phytopathogènes.

D'autres études ont montré, la production de l'AIA et/ou les sidérophores par d'autres bactéries. Steizl *et al.*, (1999) ont montré que le traitement des racines des oeillets par *Pseudomonas fluorescens* WERA17 induit la résistance de ces racines au flétrissement causé par *Fusarium oxysporum* f. sp. *dialhi*. *Trichoderma harizanum* T-203 induit des changements structuraux et chimiques des parois cellulaires des plantes ce qui augmente leur résistance aux infections par les agents phytopathogènes (Brimer et Bolound, 2004). De plus, Pandey *et al.*, (2006) ont montré l'activité multifonctionnelle additive ou synergique de *Pseudomonas putida* basée sur sa capacité à solubiliser le phosphate, à produire des antibiotiques antifongiques, des chitinases, de β-1,3-glucanase, des acides salicyliques et cyanhydriques (HCN), des sidérophores, ... Une autre étude récente, a montré que *Acinetobacter* sp. PSGB03 et *Serratia* sp. PRGB11 sont capables de solubiliser le phosphate, de produire à la fois d'antifongiques, de sidérophores, d'AIA, de chitinases et de glucanases (Indragandhi *et al.*, 2008). Actuellement, plusieurs microorganismes bénéfiques sont commercialisés pour leurs activités à la fois de bio-engrais et de biocotrôle tels que *Pseudomonas* sp. , *Acinetobacter*, *Bacillus megatrium*,... (Bano et Musarrat, 2004 ; Vassilev *et al.*, 2006b ; Wani *et al.*, 2007).

4.4.5. Renforcement de la capacité défensive de la plante

D'autre part, certaines souches de PGPR peuvent protéger les plantes d'une façon indirecte par la stimulation de mécanismes de défense inductibles dans la plante, ce qui peut rendre l'hôte beaucoup plus résistant à l'agression future par des agents pathogènes. Ce phénomène a été nommé «résistance systémique induite» (ISR, Induced Systemic Resistance) (van Loon *et al.*, 1998; Pieterse *et al.*, 2002). L'induction d'une telle capacité de défense est systémique : le traitement des racines par des PGPR produit des effets protecteurs sur d'autres parties de la plante sans migration des bactéries induit l'ISR au travers du système vasculaire de la plante ou à travers les tissus (Ramamoorthy *et al.*, 2001; Bent, 2006). Les mécanismes développés par les plantes permettent de se protéger contre un large spectre de pathogènes pas seulement fongiques, bactériens et viraux, mais aussi vis-à-vis de maladies causées par certains insectes et nématodes (Sticher *et al.*, 1997; van Loon *et al.*, 1998; Ramamoorthy *et al.*, 2001; Durrant et Dong, 2004).

5. Les microorganismes bénéfiques

Dans le sol, l'activité microbienne est intense en particulier dans la zone sous l'influence des racines, la rhizosphère, qui contient plus d'un million de microorganismes par gramme de sol. Les microorganismes trouvent en effet dans ce milieu des substrats énergétiques libérés par les racines et nécessaires à leur métabolisme : sucres, acides aminés, acides organiques, hormones.... Certains de ces microorganismes, principalement des bactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes (Hinsinger et Marschner, 2006). Certains de ces microorganismes sont épiphytiques, c'est-à-dire qu'ils colonisent les surfaces racinaires, tandis que d'autres peuvent également entrer à l'intérieur des plantes et devenir ainsi des endophytes. Certains d'entre eux peuvent également former des symbioses remarquables avec leur hôte végétal (Gay et Smith, 2005). Parmi les microorganismes bénéfiques, qu'ils soient épiphytiques ou endophytiques voire même à l'origine de symbioses remarquables (type mutualisme), existent des champignons et des bactéries (Welbaum *et al.*, 2004 ; Fravel, 2005) (Tableau 2).

Tableau 2: Les microorganismes inscrits en tant que biopesticides à l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (EPA) (Fravel, 2005).

Agent de biocontrôle	Année d'enregistrement	organisme ou maladie ciblée	Cultures concernées
<i>Agrobacterium radiobacter</i> strain K84	1979	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Plantes ornementales, fruits, noix
<i>Agrobacterium radiobacter</i> Strain K1026	1999	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> and <i>A. rhizogenes</i>	Plantes ornementales, fruits, noix
<i>Ampelomyces quisqualis</i> isolate M-10	1994	Powdery mildew	Fruits, légumes et plantes ornementales
<i>Aspergillus flavus</i> strain AF36	2003	<i>Aspergillus flavus</i>	Coton
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 21,882	2004	<i>Aspergillus flavus</i>	Cacahuète
<i>Bacillus licheniformis</i> Strain SB3086	2003	Les pathogènes et rouilles foliaires	plantes ornementales et gazon ornemental
<i>Bacillus pumilus</i> Strain GB 34	2002	<i>Rhizocotonia</i> , <i>Fusarium</i>	Soja
<i>Basillus subtilis</i> GBO3	1992	<i>Rhizocotonia</i> , <i>Fusarium</i> <i>Aspergillus</i> et d'autres	Coton, arachides, soja, blé, orge, pois et haricots
<i>Basillus subtilis</i> MBI 600	1994	<i>Rhizocotonia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Alternaria</i> et <i>Aspergillus</i>	Coton, haricot, orge, blé, corn, pois, arachides et soja
<i>Bacillus subtilis</i> Strain QST 713	2000	Pathogènes, pourriture et rouilles foliaires	Cerises, courges, raisins, légumes foliaires, poivres, pommes de terre, tomates et noix
<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>amylolique-faciens</i> strain FZB24	2000	<i>Rhizoctonia</i> et <i>Fusarium</i>	arbres d'ombre et des forêts, plantes ornementales et arbustes
<i>Candida oleophila</i> isolate I-182		Maladies après la récolte	Divers fruits, légumes, fleurs, plantes ornementales et d'autres
<i>Coniothyrium minitans</i> CON/M/91-08	2001	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> et <i>Sclerotinia minor</i>	Sol agricole
<i>Gliocadium catenulaum</i> strains JI446	1998	Pathogènes du sol	Légumes, herbes, épices, gazon, arbres et arbustes
<i>Gliocadium virens</i> GL-21	1990	Pathogènes du sol	Plantes ornementales, légumes, coton
<i>Myrothecium verrucaria</i> : fermentation solids and Solubles	1996	Nématodes parasite de la plante	Plantes alimentaires, plantes à fibres et plantes ornementales

Agent de biocontrôle	Année d'enregistrement	organisme ou maladie ciblée	Cultures concernées
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> strain 63-28	2001	<i>Pythium, Rhizoctonia solani, Fusarium oxysporum</i>	Légumes et plantes ornementales en serre
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> strain TX-1	1999	<i>Sclerotinia homeocarpa, Colletotrichum graminicola, Pythium aphanadermatum, Michrosochium nivale</i>	Gazon de cours de golf
<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506	1992	Frost damage, fire blight, bunch rot	Fruits, amande, pomme de terre et tomate
<i>Pseudomonas syringae</i> strain ESC - 10	1995	Maladies après la récolte	Pommes, poire, citron, orange ou pamplemousse
<i>Pseudomonas flocculosa</i> strain PFA22 UL	2002	Powdery mildew	Roses et concombres en serre
<i>Streptomyces griseoviridis</i> strain K61	1993	Pathogènes du sol	plantes alimentaires, petits arbustes ornementaux
<i>Trichoderma harzianum</i> ATCC 20,476	1989	Tree wound pathogens	Blessures chez les plantes ornementales, et les arbres de forêt
<i>Trichoderma harzianum</i> strain T-22	1990	Pathogènes du sol	Le sol des serres, pépinières, gazon, jardins d'amateur
<i>Trichoderma harzianum</i> strain T-39	1996	<i>Botrytis cinerea</i>	La plupart des récoltes alimentaires

5.1. Les champignons bénéfiques ou les PGPF

Des champignons appelés PGPF “ Plant Growth-Promoting Fungi” peuvent stimuler les défenses de la plante et présenter une activité antagoniste envers différents phytopathogènes, tout en stimulant directement la croissance de la plante (Whipps, 2001 ; Bent, 2006). Ils peuvent être des champignons filamentueux (Harman *et al.*, 2004) voire même des levures également appelées PGPY “ Plant Growth-Promoting Yeasts” (El-Tarably et Sivasithamparam, 2006). Chez diverses plantes, y compris les plantes herbacées, les PGPF peuvent être présents naturellement (Sinclair et Cerkauskas, 1996 ; Saikkonen *et al.*, 1998) aussi bien chez des plantes ligneuses (Arnold *et al.*, 2003), notamment la vigne (Nappi *et al.*, 1985 ; Cheng et Baumgartner, 2004 ; 2006). Chez ces plantes, les PGPF peuvent être épiphytiques et/ou endophytiques (Caroll, 1988 ; Clay, 1990 ; Faeth, 2002 ; Hahn *et al.*, 2003 ; Schardl *et al.*, 2004) et sont même à l'origine de symbioses comme le cas avec les mycorhizes (Selosse *et al.*, 2004).

Lors d'une association bénéfique entre une plante et les PGPF, divers mécanismes sont impliqués dans la protection et la stimulation de la croissance de la plante. Ces micro-organismes peuvent agir directement sur l'agent pathogène pour protéger la plante indirectement, ceci par le biais d'un mycoparasitisme et une sécrétion d'allélochimiques inhibiteurs et/ou par un phénomène de compétition pour l'espace et les nutriments (Whipps, 2001 ; Mauchline *et al.*, 2002 ; Howell, 2003), tout en fournissant des composés bénéfiques pour le développement de la plante (Harman *et al.*, 2004 ; El-Tarably et Sivasithamparam, 2006).

Ces microorganismes peuvent également stimuler les défenses des plantes, ce qui provoque une résistance de la plante contre les agents pathogènes (Bent, 2006). Des barrières structurales avec des appositions pariétales peuvent notamment se mettre en place et des phytoalexines ainsi que des protéines PR peuvent être ou non sécrétées suite à l'inoculation de la plante avec un PGPF. Cependant, la plupart des PGPF induisent une ISR à la place d'une SAR (Harman *et al.*, 2006).

Plusieurs recherches ayant porté sur l'interaction plante-PGPF mentionnent un phénomène de potentialisation des défenses. Lors de l'interaction entre la tomate et un champignon mycorhizien, *Glomus mosseae*, permettant une protection de la plante contre *Phytophthora parasitica* (Cordier *et al.*, 1998 ; Pozo *et al.*, 1999 ; 2002). Shoresh *et al.*, 2005 ont montré que les défenses sont potentialisées chez des plantes de concombres, pré-inoculés avec *Trichoderma asperellum* souche T203, suite à l'infection par une bactérie pathogène *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*, ce qui a permis une protection de la plante contre l'agent agresseur.

5.2. Les bactéries bénéfiques PGPB (“Plant Growth-Promoting Bacteria”) ou les PGPR (“Plant Growth-Promoting Rhizobacteria”)

Plusieurs travaux ont montré l'utilité des bactéries bénéfiques pour protéger les plantes contre les infections par les agents pathogènes (Raaijmakers *et al.*, 2002 ; van Loon et Bakker, 2004 ; 2005 ; Cavaglieri *et al.*, 2005; Haas et Defago, 2005). Certains peuvent de plus stimuler la croissance de leur hôte végétal et sont ainsi d'un grand intérêt pour l'agriculture (Glick, 1995 ; Welbaum *et al.*, 2004). Ces micro-organismes bénéfiques ou PGPB “Plant Growth-Promoting Bacteria” peuvent provenir de différentes niches écologiques telles que la rhizosphère, la spermosphère, la phyllosphère, voire même de l'anthosphère ou de la carposphère. Néanmoins, Hitner a décrit dès 1904 (Hartmann, 2005) que la plupart des PGPB est originaire de la rhizosphère. Elles sont de ce fait des rhizobactéries et sont ainsi appelées PGPR “Plant Growth-Promoting Rhizobacteria” (Klopper et Schroth, 1978). Dans la littérature, on peut rencontrer d'autres appellations des PGPR tels que EPR “Emergence-Promoting Rhizobacteria” (Kloepper *et al.*, 1986), PGPB (Bashan et Holguin, 1998), “biocontrol-PGPB” voir même YIB “Yield-Increased Bacteria” ; Chen *et al.*, 1996).

Les Actinomycètes PGPR peuvent présenter des activités antagonistes, induire une résistance systémique chez la plante, produire des composés stimulant la croissance des plantes, accélérer l'émergence des graines, induire une floraison précoce et voire même conférer au sol des propriétés minimisant les dégâts des plantes (Vessey, 2003 ; Welbaum *et al.*, 2004).

Cependant, à part quelques travaux préliminaires (Vercesi *et al.*, 1990, 1992 ; Petrolini *et al.*, 1991 ; Sardi *et al.*, 1992), aucune étude antérieure approfondie n'a été réalisée sur les Actinomycètes, comme nouveau groupe bactérien potentiellement utile, à la fois, à la croissance, la stimulation des mécanismes de défenses et la protection des plantes en particulier la vigne.

6. Les Bactéries Actinomycétales

6.1 Généralités

Les actinomycètes ont été à l'origine de la découverte de l'actinomycine par Wacksman en 1940 à partir d'une culture de *Streptomyces antibioticus* (Wacksman & Woodruff, 1940) et de la streptomycine chez *Streptomyces griseus* (Shartz *et al.*, 1944). A ce jour, ces bactéries tiennent une très grande importance dans le domaine de la biotechnologie des antibiotiques malgré les progrès de synthèse chimique. En effet, 75% des antibiotiques connus sont naturellement issus des actinomycètes et plus particulièrement du genre *Streptomyces*.

De point de vue taxonomique, les actinomycètes appartiennent au règne des procaryotes, division des firmicutes (bactéries Gram positif), classe des thallobacteria (bactéries filamenteuses) et à l'ordre des actinomycétales (Murray *et al.*, 1989).

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses dont la croissance donne lieu à des colonies constituées d'hyphes, c'est à dire des filaments qui irradient, par croissance centrifuge, tout autour du germe qui leur a donné naissance. Cela explique leur dénomination le mot «Actinomycètes» provient de deux substantifs grecs «Actino» et «Mycete» et signifie «champignons à rayon» ou «champignons rayonnants», expression utilisée pour désigner en anglais (Ray fungi) et aussi en allemand et en russe. Ils présentent un cycle biologique semblable à celui de certains champignons, mais leur structure procaryotique, sans noyau distinct, les a classés parmi les Bactéries (Figure 7).

Physiologiquement et écologiquement, les actinomycètes sont aérobies mais certaines sont aérobies facultatives. Ces bactéries sont hétérotrophes ou chimiotrophes mais la plupart sont des chimio-hétérotrophes capables d'utiliser une grande variété de sources d'énergie y compris les polymères complexes (Lechevalier , 1988 ; Zimmerman, 1990).

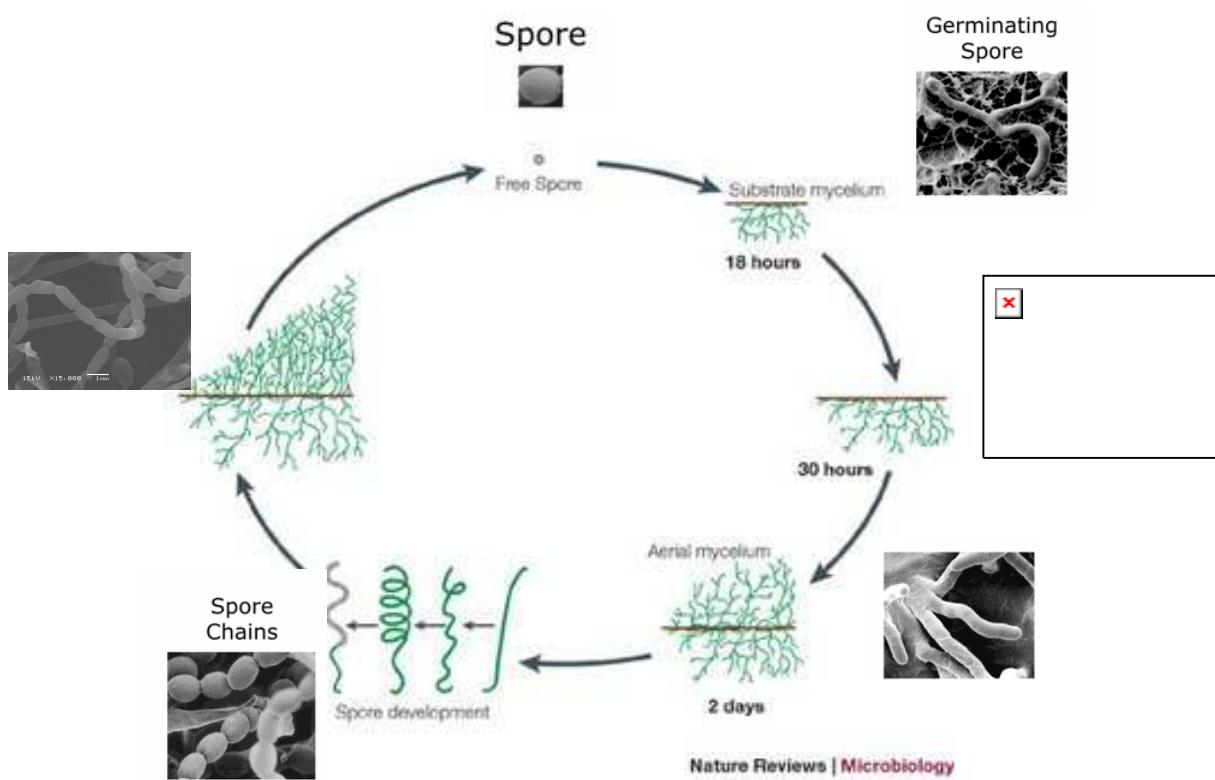


Figure 7: Cycle de développement des Actinomycètes sur milieu solide (Breton *et al.*, 1989) .

6.2. Les actinomycètes dans le sol

Les actinomycètes sont adaptés à divers milieux écologiques, ainsi, ils peuvent être dans les sols, les eaux douces ou salines et dans l'air. Toutefois, ils se trouvent abondamment dans le sol que les autres milieux, spécialement dans les sols alcalins et les sols riches en matière organique où ils constituent une part importante de la population microbienne.

Les actinomycètes se trouvent aussi bien à la surface du sol qu'à plus deux mètres de profondeur (Breton *et al.*, 1989). Waksman (1950) a décrit qu'à un mètre de profondeur d'un sol cultivé et à deux mètres de profondeur d'un sol sableux, leur nombre dépasse celui des autres microorganismes.

Le nombre d'actinomycètes est variable selon les biotopes et les conditions climatiques. Le plus souvent, leur densité est de l'ordre de 10^6 - 10^9 cellules par gramme de sol (Goodfellow *et al.*, 1983) et le genre *Streptomyces* représente plus de 95% des souches actinomycétales isolées dans la plupart des sols (Williams & Vickers, 1988).

La première étude menée par Hiltner & Strömer (1903), sur l'effet des conditions climatiques sur la distribution des actinomycètes, a montré qu'au printemps, ils constituent 20% de la flore microbienne du sol. En automne, ils dépassent 30% et cette augmentation est due aux quantités importantes de résidus de plantes disponibles à cette période de l'année. En hiver, il y a une diminution de ce pourcentage (13%) à cause du gel.

D'autres facteurs tels que la température, le pH et l'humidité du sol influencent également la croissance des actinomycètes. Comme les autres bactéries du sol, la plupart des actinomycètes se comportent comme des bactéries mésophiles avec croissance optimale située entre 25° et 30°C. Toutefois, il existe des souches thermophiles isolées à une température située entre 50° et 60°C (Edwards, 1993).

Pour ce qui est du pH, la plupart des actinomycètes se comportent comme des bactéries neutrophiles. Leur croissance est meilleure à pH compris entre 6 et 9, avec un maximum autour de la neutralité. Cependant, certaines souches de Streptomycètes ont été isolées à partir des échantillons de sol acide (pH 3,5) (Nioh *et al.*, 1995).

La croissance du mycélium végétatif des actinomycètes dans le sol est favorisée par un faible taux d'humidité, particulièrement quand les spores sont remplies d'eau. Dans les sols secs où la tension d'humidité est plus grande, la croissance devient très limitée voir même arrêtée.

Les actinomycètes peuvent se conserver durant de longues périodes grâce aux spores, ces dernières germent au contact d'éléments nutritifs exogènes dont la nature est déterminante (Goodfellow & Williams, 1983).

6.3 Relations plantes-Actinomycètes

Les actinomycètes sont des microorganismes capables de coloniser la rhizosphère grâce à leurs caractères antagonistes et compétitifs vis-à-vis des autres microorganismes du sol. Certains sont connus pour leur production de sidérophores qui permettent de chélater le fer ainsi privant le fer des autres microorganismes (Cao *et al.*, 2005 ; Getha *et al.*, 2005). La production de sidérophores par *S. griseorubiginouse* est efficace dans la lutte contre la fusariose du bananier causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubenese* (Getha *et al.*, 2005). D'autres sont parasites de champignons en produisant des enzymes qui leur permettent de dégrader la paroi des cellules fongiques ; le parasitisme des mycélia de champignons par les actinomycètes a été décrit dans plusieurs travaux (Yuan et Crawford, 1995 ; Kham *et al.*, 1997 ; Tréjo-Estrada *et al.*, 1998 ; El-Tarably *et al.*, 2000 ; Xiao *et al.*, 2002 ; El-Tarably et Sivasithampar, 2006 ; Errakhi *et al.*, 2007 ; Jain et Jain, 2007). Plusieurs enzymes chitinolytiques ont été identifiés chez certaines espèces d'actinomycètes dont *S. antibioticus* (1966), *S. lividens* (Miyashita *et al.*, 1991), *S. lydicus* WYEC108 (Mahadevan et Crawford, 1997), *S. plicatus* (Abd-Allah, 2001) et *S. halsteii* AJ-7 (Joo, 2005).

Les actinomycètes peuvent agir également par compétition nutritionnelle et spatiale contre les microorganismes phytopathogènes. Leur faculté d'adaptation à différents milieux rhizosphériques leur permet d'être un bon compétiteur. Certaines espèces sont symbiotiques des plantes supérieures, ces bactéries endophytiques forment des associations appelées actinorhizes permettant la fixation d'azote (Davidson, 1988). Le genre *Frankia* établit une association symbiotique avec plusieurs phanérogames. L'exemple le plus connu est l'aulne

(*Alnus*) où ces actinomycètes forment au niveau des racines, des nodules où l'azote gazeux est fixé grâce à une nitrogénase (Baker, 1988).

Les actinomycètes sont de plus, connues par leur capacité de produire des antibiotiques qui leur permettent d'inhiber les agents phytopathogènes (Emmert et Handelsman, 1999 ; Barakate *et al.*, 2002 ; El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006). Tréjo-Estrada *et al.*, (1998) ont montré une corrélation entre la production d'antibiotiques dans le sol et l'efficacité des actinomycètes dans la lutte contre les agents phytopathogènes. Par exemple, *Streptomyces violaceusniger* YCED9 produit trois composés antifongiques dont la nigrecine, la geltanamycine et la guanidylfingine impliquées dans la lutte contre les agents phytopathogènes (Tréjo-Estrada *et al.*, 1998). De même, plusieurs antibiotiques produits par les actinomycètes sont actuellement utilisés dans la lutte biologique (Tableau 3).

6.4. Les antibiotiques produits par les actinomycètes

Les actinomycètes constituent une source importante d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires à utilité industrielle (Takahashi et Omura, 2003 ; Hayakawa *et al.*, 2004). Plus de 70% des antibiotiques d'origine microbienne sont produits par ce vaste groupe bactérien (Gundliffe, 2006) (Tableau 3). Les actinomycètes produisent un grand nombre d'antibiotiques de structure chimique très variées (aminoglycosides, anthracyclines, glycopeptides, beta-lactamines, tetracyclines, macrolides, nucliosides) qui ont de nombreuses applications thérapeutiques (Okami et Hotta, 1988).

Les Streptomycètes à eux seuls sont à l'origine de plus de 80% des antibiotiques secrétés par les actinomycètes (Sanglier *et al.*, 1996). Certaines espèces ne produisent qu'un seul antibiotique, d'autres peuvent produire plusieurs antibiotiques. *Streptomyces hygroscopicus* à elle seule peut produire 58 antibiotiques différents (Breton *et al.*, 1989).

Cependant, depuis ces dernières années, les chercheurs se sont intéressés à la recherche d'actinomycètes rares (autre que les *Streptomyces* sp.) dans le but de trouver de nouvelles molécules bioactives. Par exemple, les Actinoplanètes (Hayakawa *et al.*, 2003), *Kitasatospora* sp. (Takahashi et Omura, 2003), *Sacharotrix* sp. (Zitouni *et al.*, 2005).

Tableau 3 : Exemple d'antifongiques produits par les actinomycètes utilisés en agriculture.

Antifongique	Organisme producteur	Références
Oligomycin A	<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	Smith <i>et al.</i> , 1954
Natamycin	<i>Streptomyces natalensis</i>	Struyk <i>et al.</i> , 1958
Kasugamycin	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	Umezawa <i>et al.</i> , 1965
Polyoxine B	<i>Streptomyces cacaoi</i>	Isono <i>et al.</i> , 1965
Fungichromine	<i>Streptoverticillium cinnamomeum</i>	Umezawa <i>et al.</i> , 1965
Validamycin	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Iwasa <i>et al.</i> , 1970
Galbonolides A et B	<i>Streptomyces galbus</i>	Fauth <i>et al.</i> , 1986
Blasticidine S	<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	Agrios, 1988
Nikkomycin	<i>Streptomyces tendae</i>	Decker <i>et al.</i> , 1990
Guanidylfungin A (AFA)	<i>S. violaceusniger</i> YCED-9	Trejo-Estrada <i>et al.</i> , 1998
Kitamycin	<i>Streptomyces sp.</i>	Hayashi et Nozaki, 1999
Fungichromin	<i>Streptomyces padanus</i>	Shih <i>et al.</i> , 2003

6.5. Taxonomie des actinomycètes

Depuis plusieurs années, la taxonomie des actinomycètes a connu une évolution importante en fonction du développement des connaissances. Ce groupe de microorganismes procaryotes appartient à l'ordre des Actinomycétales crée par Buchaman en 1917 (in Bergy's 1989). Selon Lechevalier et Lechevalier (1965), la classification des espèces dans cet ordre devait être faite selon des critères morphologiques et chimiques. Malgré l'efficacité de ce type de classification, l'adoption des critères génétiques est devenue essentielle vu le nombre d'espèces découvertes ces dernières années.

6.5.1. Classification des actinomycètes

6.5.1.1. Classification morphologique

L'étude morphologique des actinomycètes se base essentiellement sur la présence ou l'absence du mycélium du substrat et le mycélium aérien, la couleur du mycélium, la production et la couleur de pigments diffusibles, la production de pigments mélanoïdes et la structure et la forme des spores (Figure 8).

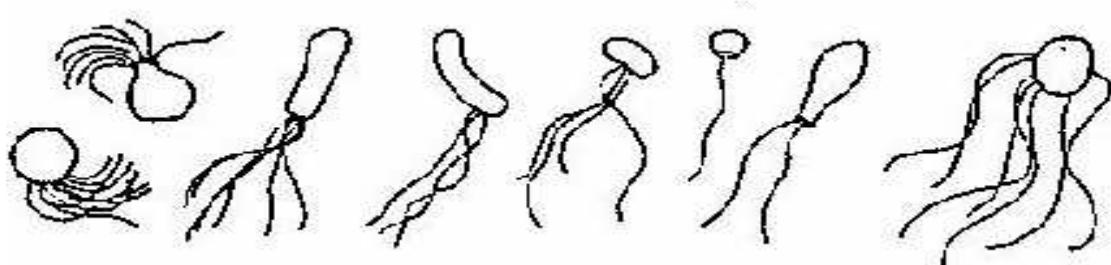
La plupart des actinomycètes présentent un mycélium de substrat et un mycélium aérien. Souvent la ramification du mycélium de substrat est monopodiale, de rares actinomycètes tels que *Thermoactinomyces*, présentent une ramification dichotomique (Kalakoutski & Agre, 1976). Certains actinomycètes sont dépourvus de mycélium aérien et ne présentent que le mycélium de substrat (*micromonosporacées*). Tous les actinomycètes forment un mycélium de substrat, sauf le genre *Sporichtya* qui présente un mycélium aérien qui se fixe au milieu de culture par des crampons. Certaines *Rodococci* forment des filaments allongés sur le substratum et ne produisent pas de vrai mycélium (Locci & Shaal, 1980). Les *Nocardiformes* ont la particularité d'avoir un mycélium de substrat qui se fragmente (Prauser, 1981).

D'autre part, les spores représentent un critère fondamental dans la taxonomie des actinomycètes (Locci & Sharples, 1984). Chez les genres *Micropolyspora* et *Micromonospora* et les *Thermoactinomycètes*, la formation des spores se fait directement sur le mycélium de substrat (Cross & Goodfellow, 1973). Chez les Streptomycètes, les spores surmontent le mycélium aérien. Les spores mobiles caractérisent le groupe des Actinoplanes et *Actinosynnema*, alors que *Thermoactinomyces* présente des endospores uniques thermorésistants (Cross & Goodfellow, 1973). Les spores flagellées caractérisent les *Oerskovia* sp..

Formes générales de spores



Position des flagelles sur les spores mobiles



Ornementation des spores

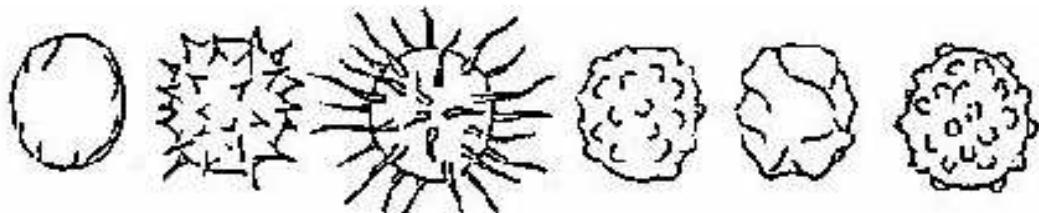


Figure 8 : Morphologie des spores des actinomycètes (Breton *et al.*, 1989).

Le nombre de spores est un caractère de classification important, ainsi *Micromonospora*, *Thermomonospora*, *Saccharomonospora* et *Promicromonospora* ne produisent que des spores isolées, *Microbispora* produit des spores en paires longitudinales. *Actinomadura*, *Sporichtha*, et certaines *Nocardia* présentent des chaînes de spores très courtes (inférieures à 20) alors que *Streptomyces*, *Nocardoides*, *Kitasatosporia*, *Streptoverticillium* et certaines *Nocardia* sont caractérisés par la présence de longues chaînes de spores. Les chaînes de spores du genre *Streptomyces* sont soit droites (type Rectis), sinuées (type Rectiflexibilis) ou spirales (types Spirales) alors que le genre *Streptoverticillium* présente des chaînes de spores en verticilles. Certains actinomycètes présentent des sclérotes (genre *Chainia*) ou des synnemas (*Actinosynnema*) ou des vésicules qui contiennent des spores (*Frankia*) ou dépourvues de spores (Intrasporangium). Les sporanges caractérisent les genres *Actinoplanes*, *Ampulariella*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Dactylosporangium* et *Streptosporangium*.

La figure 9 présente les différents types de spores et sporanges rencontrés chez les actinomycètes.

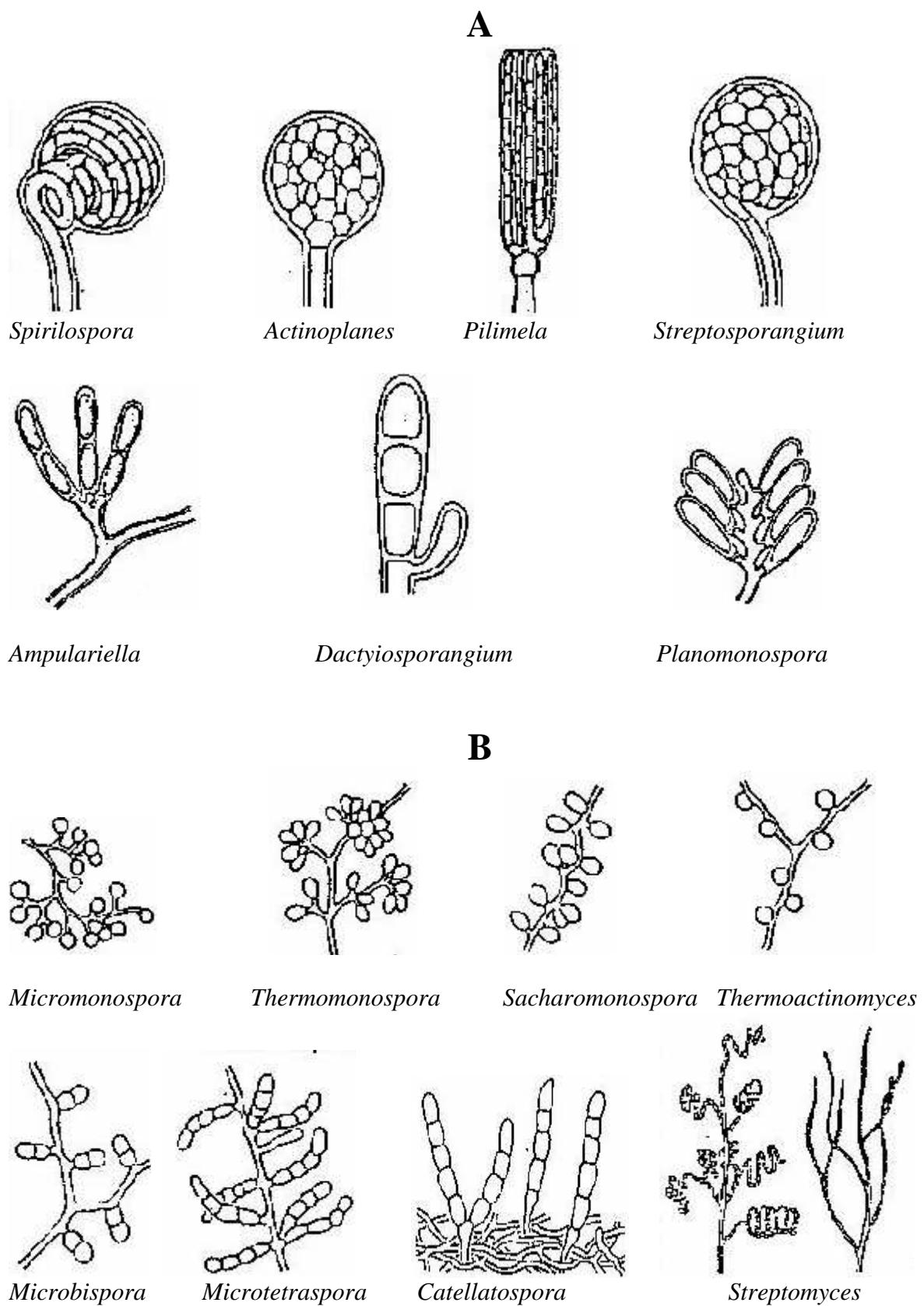


Figure 9 : Différents chaînes de spores chez les Actinomycètes ; spores endogènes (A) et spores exogènes (B) (Breton *et al.*, 1989).

6.5.1.2. Classification chimiotaxonomique

Selon Goodfellow & Minnikin, 1985, la chimiotaxonomie consiste en l'utilisation des caractères chimiques dans la classification des organismes. Ces caractères ont été surtout étudiés au niveau des parois cellulaires. En effet, les caractères morphologiques adoptés par la classification classique dépendent de la nature des composés chimiques des microorganismes (O'Donnell, 1988). Les composés majeurs adoptés par cette classification sont les acides aminés pariétaux, les lipides des enveloppes cellulaires et les sucres cellulaires (Lechevalier & Lechevalier, 1980).

L'acide diaminopimélique (DAP) présent au niveau des parois de la plupart des actinomycètes sous deux formes isomériques ; la forme LL et la forme DL ou meso. Les parois sont classées en huit groupes chimiques ou chémotypes pariétaux en fonction de leur composition en DAP mais aussi en d'autres acides aminés (Tableau 4) :

Chémotype I: Ce groupe est représenté par les micro-organismes ayant la forme L-DAP et la glycine, il s'agit de *Streptomyces* et *Nocardioïdes*.

Plusieurs genres d'actinomycètes possèdent le DAP sous sa forme meso-DAP, la distinction entre eux peut se faire sur la base de leur composition en sucre:

Chémotype II: ce groupe est représenté par les micro-organismes ayant la forme meso-DAP et glycine, en plus de l'arabinose et du xylose, il s'agit d'*Actinosynnema* et *Actinomyces*.

Chémotype III: ce groupe est représenté par les micro-organismes possédant uniquement le DAP sous forme meso en plus du madurose (3-O-methyl-D-galactose), il s'agit des *maduromycètes*, *Dermatophilus*, *Thermomonospora*, *Thermoactinomyces* et certaines *Frankia*.

Chémotype IV: ce groupe est caractérisé par la présence de meso DAP, d'arabinose et de galactose, il s'agit des *Nocardiformes*, *Saccharomonospora* et de *Micropolyspora*.

Certaines actinomycètes ne présentent pas de DAP au niveau de leur paroi, il s'agit de *Oerskovia* et *Promicromonospora*. Certains actinomycètes possèdent d'autres acides aminés comme constituants majeurs de leur paroi.

Chémotype V: ce groupe est caractérisé par la présence de la lysine et de l'ornithine, il est représenté par le genre *Actinomyces*.

Chémotype VI: ce groupe est caractérisé par la présence d'acide aspartique et de galactose: *Microbacterium*, *Oerskovia* et certains *Actinomyces*.

Chémotype VI: ce groupe est caractérisé par la présence d'acide diaminobutyrique et de glycine, il s'agit d'*Agromyces* et de *Clavibacter*.

Chémotype VI: présence d'ornithine, il s'agit de *Cellulomonas* et d'*Aureobacterium*.

Il convient de noter que la combinaison des caractères morphologiques et des caractères chimiques peut permettre de distinguer les bactéries d'un même groupe et entre les diverses familles actinomycétales. En effet, Lechevalier & Lechevalier (1965) ont proposé un système de classification des actinomycètes basé sur des caractères morphologiques et chimiques. Ainsi les genres *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Arachnia* et *Nocardoides* ont le même chémotype (chémotype I) bien qu'ils appartiennent à des familles différentes de part leur morphologie. En effet, il est aisément possible de les distinguer les unes des autres par le fait que *Streptomyces* présentent de longues chaînes de spores et *Streptoverticillium* montre des chaînes de spores en verticilles. Les mycelia de ces deux genres ne se fragmentent pas tandis que *Nocardoides* présente un mycélium aérien et de substrat qui se fragmentent. *Arachnia* ne possède pas de mycélium aérien.

Par ailleurs, certains actinomycètes ne possèdent pas de DAP pariétal, il s'agit de *Promicromonospora* et *Oerskovia*.

D'autres éléments de la composition chimique sont aussi pris en considération pour une complète distinction entre les différents genres. Ces caractères sont représentés par la nature du peptidoglycane, des lipides (les acides gras, les ménaquinones et les phospholipides). Ainsi, cinq profils ont été définis sur la base de la nature des phospholipides (Lechevalier & Lechevalier, 1981), et quatre profils sur la base de la nature des acides gras estérifiés au sein des phospholipides.

Tableau 4 : Différents types de parois et leurs constituants majeurs chez les actinomycètes (Murray *et al.*, 1989).

Type de paroi	Constituants pariétaux majeurs	Groupe/Genre
I	L-DAP + Glycine	<i>Arachnia, Pimelobacter, Nocardoides, Streptomyces</i>
II	Méso-DAP+ Glycine	<i>Actinoplanes, Actinomyces</i>
III	Méso-DAP	<i>Dermatophilus, Maduromycetes, Frankia, Geodermatophilus, Thermanospora, Kitasatospira, Spirillosporia, Thermoactinomyces</i>
IV	Méso-DAP+ Arabinose	<i>Micropolyspora, Nocardioformes</i>
V	Lysine + Ornithine	<i>Actinomyces</i>
VI	Présence variable de l'acide Aspartique et de galactose	<i>Microbacterium, Oerskovia, Promicromonospora, Actinomyces, Arcanobacterium</i>
VII	Acide diaminobutyrique + Glycine	<i>Agromyces, Calvibacter</i>
VIII	Ornithine	<i>Aureobacterium, Curtobacterium, Cellulomonas</i>

6.5.1.3. Classification moléculaires

Ces dernières décennies, la biologie moléculaire s'est imposée comme un outil puissant et incontournable en taxonomie. Actuellement, il n'est plus possible de proposer une nouvelle espèce sans effectuer des analyses génétiques.

Les principales analyses moléculaires utilisées pour la détermination des espèces sont le séquençage de l'ADN ribosomal 16S (Figure 10) et l'hybridation ADN-ADN. Le pourcentage G+C n'est obligatoirement demandé que lors d'une proposition de nouveaux genres.

Le séquençage de L'ADNr 16S commence par l'extraction de l'ADN génomique puis l'amplification de l'ADNr par l'utilisation des amorces spécifiques et cela par l'outil de la PCR (réaction de polymerase en chaîne). Par la suite, le produit de la PCR est utilisé pour séquencer la partie du 16S ADNr. Les séquences obtenues après amplification sont soumises à des études de comparaison (ou encore phylogénie) entre elles ou bien avec des espèces de référence répertoriées dans des banques de données génomiques.

Tout comme l'analyse de l'ADNr, la réassociation ADN-ADN est utilisée pour l'identification des espèces et la comparaison avec celles déjà décrites. Deux espèces sont considérées différentes si elles ont un taux de ressemblance (taux de réassociation de leurs brins d'ADN) inférieur à 70% (Wayne *et al.*, 1987).

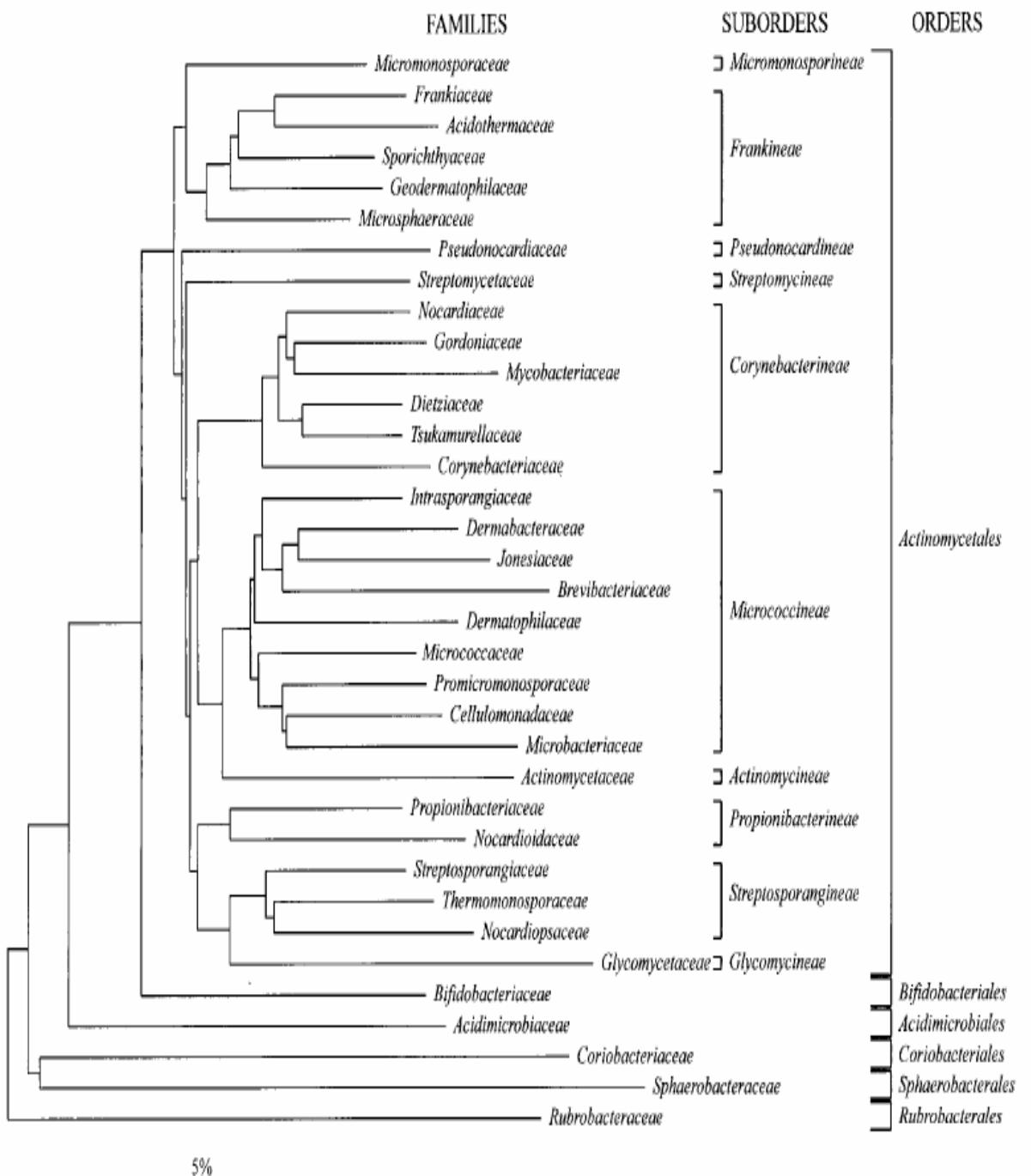


Figure 10: Classification du phylum des Actinobactéria basée sur des données de séquençage de l'ARNr. 16S. La barre représente 5 substitutions de nucléotides par 100 nucléotides (Stackebrandt *et al.*, 1997).

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Agrios G.N.** (1988) Plant Pathology. Academic Press. Inc. San Diego. CA. U.S.A.
- Agüero C.B., Uratsu S.L., Greve C., Powell A.L.T., Labavitch J.M., Meredith C.P. and Dandekar A.M.** (2005) Evaluation of tolerance to Pierce's disease and Botrytis in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear PGIP gene. Molecular Plant Pathology 6: 43-51.
- Aigrain P.** (1999) Conjoncture viti-vinicole mondiale. Le Progrès Agricole et Viticole 116: 175-182.
- Aigrain P.** (2002) Conjoncture mondiale - note Office International de la Vigne et du Vin. Onivins Infos 94: 1-16.
- Alabouvette C., Eparvier A., Couteaudier Y. & Steinberg C.** (1991) Methods to be used to study the competitive interactions between pathogenic and non-pathogenic *Fusarium* spp. In the rhizosphere and at the root surface. Proceeding workshop on new approaches in biological control of soilborne disease, Copenhagen, Denmark. 30 june-4july.
- Alexander M.** (1977) Introduction to soil microbiology. John Wiley and Sons, Inc., pp.36-51.
- Alexander D., Goodman R.M., Gut-Rella M., Glascock C., Weymann K., Friedrich L., Maddox D., Ahl-Goy P., Luntz T., Ward E. and Ryals J.** (1993) Increased tolerance to two oomycetes pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90: 7327-7331.
- Atkinson M.M., Midland S.L., Sims J.J. and Keen N.T.** (1996) Syringolide 1 triggers Ca^{2+} influx, K^+ efflux and extracellular alkalinization in soybean cells carrying the disease resistance gene RPg4. Plant Physiol. 112: 297-302.
- Arnold A.E, Mejía L.C., Kyllo D., Rojas E.I., Maynard Z., Robbins N. and Herre E.A.** (2003) Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100: 15649-15654.
- Baker D.D.** (1988) Opportunities for autoecological studies of *Frankia*, a symbiotic actinomycete. In "Biology of Actinomycetes '88" Okami Y., Beppu T. & Ogawara H., Tokyo: Japan Scientific Societies Press Ed., pp: 271-276.
- Bano N., Musarrat J.** (2004) Characterization of a novel carbofuran degrading *Pseudomonas* sp. with collateral biocontrol and plant growth promoting potential. FEMS Microbiol. Lett. 231 :13-17.
- Bashan Y. and Holguin G.** (1998) Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. Soil Biology and Biochemistry 30: 1225-1228.

- Bèhal V.** (2000) Bioactive products from Streptomyces. Advances in Applied Microbiology 47, 113-156.
- Benítez T., Rincón A.M., Limón M.C., Codón A.C.** (2004) Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. International Microbiology 7, 249-260.
- Bennett R.N. and Wallsgrove R.M.** (1994) Secondary metabolites in plant defence mechanisms. New Phytologist 127: 617-633.
- Bent E.** (2006) Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). In: Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants (Tuzun S. and Bent E., eds), Springer Science+Business Media, New York, United States of America, pp. 225-258.
- Berdy J.** (2005) Bioactive microbial metabolites. J. Antibiot. (Tokyo) 58, 1-26.
- Bézier A.** (2003) Caractérisation de gènes de défense exprimés par la vigne en réponse à l'infection par *Botrytis cinerea* par la technique de differential display RT-PCR. Thèse de doctorat, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France, pp. 1-337.
- Bézier A., Lambert B. and Baillieul F.** (2002) Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology 108(2): 111-120.
- Bézier A., Mazeyrat-Gourbeyre F., Bonomelli A., Varnier A.-L., Paquis S., Hachet C., Manteau S., Dorey S., Dhondt-Cordelier S., Clément C. and Baillieul F.** (2007) Identification of grapevine genes regulated upon *Botrytis cinerea* infection by differential display. In: Macromolecules and Secondary Metabolites of Grapevine and Wine (Jeandet P., Clément C. and Conreux A., eds), Lavoisier, Paris, France, pp. 69-74.
- Black C.A.** (1968) Soil-plant relationships. New York, USA, John Wiley & Sons.
- Bonomelli A., Mercier L., Franchel J., Baillieul F., Benizri E. and Mauro M.C.** (2004) Response of grapevine defenses to UV-C exposure. American Journal of Enology and Viticulture 55: 51-59.
- Bouizgarne B., El-Maarouf-Bouteau H., Madiona K., Biligui B., Monestiez M., Pennarun A.M., Amiar Z., Rona J.P., Ouhdouch Y., El Hadrami I., Bouteau F.** (2006) A putative role for fusaric acid in biocontrol of the parasitic angiosperm Orobanche ramosa. Mol. Plant Microbe. Interact. 19, 550-556.
- Breton A., Theilleux J., Sanglier J.J., Viobis G.** (1989) Organismes producteurs: biologie, taxonomie et écologie. In “Biotechnologie des Antibiotiques”. Larpent J.P. et Sanglier J.J., Masson, Paris, pp: 33-70.

- Bright J., Desikan R., Hancock J.T., Weir I.S. and Neill S.J.** (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant Journal* 45: 113-122.
- Brimner T.A. & Boland G. J.** (2004) A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 100: 3–16.
- Brown A.E., Hamilton J.T.G.** (1993) Indole-3-ethanol produced by *Zygorrhynchusmoelleri*, and indole-3-acetic acid analogue with antifungal activity. *Mycol. Res.* 96, 71–74.
- Bugaret Y.** (2002) <http://www.inra.fr/hyp3>
- Busam G., Kassemeyer H.H. and Matern U.** (1997) Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiology* 115: 1029-1038.
- Candelier P., Renard I.** (2002) <http://pro.sirtem.fr/gdv/index.html>
- Cao L., Qiu Z., You J., Tan H., Zhou, S.** (2004) Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Lett. Appl. Microbiol.* 39: 425-430.
- Cao L., Qiu Z., You J., Tan H., Zhou S.** (2005) Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiol. Lett.* 247 : 147-152.
- Carroll G.** (1988) Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogens to mutualistic symbionts. *Ecology* 69: 2-9.
- Cavaglieri L., Orlando J., Rodriguez M.I., Chulze S. and Etcheverry M.** (2005) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the maize root level. *Res. Microbiol.* 156(5-6):748-754.
- Chadefaud M. and Emberger L.** (1960) Les végétaux vasculaires. In: *Traité de Botanique*, Vol. 2, Masson, Paris, France, pp. 1-1450.
- Chen Y.P., Mei R., and Lu S.** (1996) The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: *Management of Soil-Born Diseases* (Gupta V.K. and Utkhede R., eds), M/S Narosa, Kalayani Publisher, New Delhi, India, pp. 165-176.
- Cheng X. and Baumgartner K.** (2004) Arbuscular mycorrhizal fungi-mediated nitrogen transfer from vineyard cover crops to grapevines. *Biology and Fertility of Soils* 40: 406-412.
- Cheng X. and Baumgartner K.** (2006) Effects of mycorrhizal roots and extraradical hyphae on N uptake from vineyard cover crop litter and the soil microbial community. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 2665-2675.

Chet I. & Inbar J. (1994) Biological control of fungal pathogens. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 48: 37-43.

Christensen A.B., Cho B.H., Næsby M., Gregersen P.L., Brandt J., Madriz-Ordeñana K., Collinge D.B. and Thordal-Christensen H. (2002) The molecular characterisation of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology* 3: 135-144.

Clark J. (2002) <http://www.ipm.ucdavis.edu>

Clay K. (1990) Fungal endophytes of grasses. *Annual review of Ecology and systematics* 21: 275-297.

Comménil P., Brunet L. and Audran J.C. (1997) The development of the grape berry cuticle in relation to susceptibility to bunch rot disease. *Journal of Experimental Botany* 48: 1599-1607.

Compan S., Duffy B., Nowak J., Clément C. and Barka E.A. (2005a) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4951-4959.

Compan S., Reiter B., Sessitsch A., Nowak J., Clément C. and Ait Barka E. (2005b) Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1685-1693.

Cook R.J. & Baker K.F. (1983) The nature and practice of biological control of plant pathogens. *Americ. Phytopathol. Society*. 530pp.

Cordelier S., de Ruffray P., Fritig B. and Kauffmann S. (2003) Biological and molecular comparison between localized and systemic acquired resistance induced in tobacco by a *Phytophthora megasperma* glycoprotein elicitor. *Plant Molecular Biology* 51: 109-118.

Cordier C., Pozo M.J., Barea J.M., Gianinazzi S. and Gianinazzi-Pearson V. (1998) Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 1017-1028.

Cornelissen B.J. and Melchers L.S. (1993) Strategies for control of fungal disease with transgenic plants. *Plant Physiology* 101: 709-712.

Cross J.V., Polonenko D.R. (1996) An industry perspective on registration and commercialization of biocontrol agents in Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 18, 446-454.

Cross T., Goodfellow M. (1973) Taxonomy and classification of the actinomycetes. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* 2, 111-112.

- Dangl J.L. and Jones J.D.G.** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833.
- de Bary A.H.** (1879) De la symbiose. *Revue internationale des Sciences* 3: 301-309.
- de Bary A.H.** (1866) "Morphologie und physiologie der pilze. Flechten und Myxomyceten". In: Hofmeister's Handbook of Physiological Botany. Vol II, Leipzig, Germany, pp. 1-316.
- De Lorenzo G., d'Ovidio R. and Cervone F.** (2001) The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogen fungi. *Annual Review of Phytopathology* 39: 313-335.
- de Meyer G. and Höfte M.** (1997) Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology* 87: 588-593.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A. & Lamb C.** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588.
- Delledonne M., Zeier J., Marocco A. and Lamb C.** (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 13454-13459.
- Delledonne M.** (2005) NO news is good news for plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 390-396.
- Derckel J.P, Legendre L., Audran J.C, Haye B. & Lambert B.** (1996) Chitinases of the grapevine (*Vitis vinifera* L.): five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues. *Plant Science* 119: 31-37.
- Derckel J.P, Audran J.C, Haye B., Lambert B. & Legendre L.** (1998) Characterization, induction by wounding and salicylic acid, and activity against *Botrytis cinerea* of chitinases and β -1,3-glucanases of ripening grape berries. *Physiologia Plantarum* 104: 56-64.
- Derckel J.P, Baillieul F., Manteau S., Audran J.C, Haye B., Lambert B. & Legendre L.** (1999) Differential induction of grapevine defences by two strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 89(3): 197-203.
- Donaldson P.A., Anderson T., Lane B.G., Davidson A.L. and Simmonds D.H.** (2001) Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat gf-2.8 (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotina sclerotiorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59: 297-307.
- Dong X.** (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1(4):316-323.

Dong X. (2001) Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 309-314.

Dorey S., Baillieul F., Saindrenan P., Fritig B. and Kauffmann S. (1998) Tobacco class I and class II catalases are differentially expressed during elicitor-induced hypersensitive cell death and localized acquired resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 1102-1109.

Droog F. (1997) Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau. *J. Plant Growth Regul.* 16, 95–107.

Duffy B. K. and Défago G. (1999). Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(6):2429-2438.

Durner J., Wendehenne D. and Klessig D.F. (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADPribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(17):10328-10333.

Durrant W.E. and Dong X. (2004) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42: 185-209.

Edwards C. (1993) Isolation properties and potential application of thermophilic actinomycetes. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 42, 161-179.

Eichhorn K.W. & Lorenz H.K. (1977) Phäenologische Entwicklungsstadien der Rebe. *Nachrichtenblatt der Deutshe Planzenschutzdienstes* 29:119-120.

Eisendle M., Oberegger H., Buttinger R., Illmer P. & Haas H. (2004) Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacCmediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. *Euk. Cell* 3: 561-563.

Elad Y. (1995) Mycoparasitism. In: Kohmoto K, Singh US, Singh RP, (eds) *Pathogens and host specificity in plant diseases. II. Eucaryotes*, UK, Pergamon Press, pp 285–307.

Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N. (2004) *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems-an introduction. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N., eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-9.

El-Tarabily K.A., Hardy G.E.S.T.J., Sivasithamparam K., Hussain A.M., Kurtboke D.I. (1997) The potential for the biological cavity-spot disease of carrot, caused by *Pytiun coloratum*, by streptomycetes and non-streptomycete actinomycetes. *New Phytologist*. 137, 495-507.

- El-Tarablya K.A., Sivasithamparam K.** (2006) Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol. Bioch.* 34, 1-16.
- El-Tarably K.A., Soliman M.H., Nassar A.H., Al-Hassani H.A., Sivasithamparam K., McKenna F., Hardy G.E.** (2000) Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathol.* 49, 573–583.
- Elmer P.A.G. and Reglinski T.** (2006) Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology* 55: 155-177.
- Emmert E.A.B. & Handelsman J.** (1999) Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol Lett.* 171 : 1- 9.
- Errakhi R., Bouteau F., Lebrihi A., Barakate M.** (2007) Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris L.*). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 1503-1509.
- Esquerré-Tugayé M.-T., Campargue C. and Mazau D.** (1999) The response of plant cell wall hydroxyprolin-rich glycoproteins to microbial pathogens and their elicitors. In: *Pathogenesis Related Proteins in Plants* (Datta S.K. and Muthukrishnan S., eds), CRC Press, Boca Raton, Florida, United States of America, pp. 157-170.
- Fabre B., Armau E., Etienne G., Legendre F., Tiraby, G.** (1988) A simple screening method for insecticidal substances from actinomycetes. *J. Antibiot. (Tokyo)* 41, 12-219.
- Faeth S.H.** (2002) Are endophytic fungi defensive plant mutualist? *Oikos* 98: 25-36.
- Fauth U., Zahner H., Muhlenfeld A., Achenbach H.** (1986) Galbonolides A and B-two nonglycosidic antifungal macrolides. *J. Antibiot.* 39, 1760-1764.
- Ferreira J.H.S.** (1990) *In vitro* evaluation of epiphytic bacteria from table grapes for the suppression of *Botrytis cinerea*. *South African Journal of Enology and Viticulture* 11: 38-41.
- Feussner I. and Wasternack C.** (2002) The lipoxygenase pathway. *Annual Review in Plant Biology* 53: 275-297.
- Flor H.H.** (1942) Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 32: 653-669.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H.F., Miedema H., Mylona P., Torres M.A., Linstead P., Brownlee C., Jones J.D.G., Davies J. and Dolan L.** (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442-446.
- Fravel D.R.** (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:337-359.

- Fravel D.R., Rhodes D.J. and Larkin R.P.** (1999) Production and commercialization of biocontrol products. In Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops, edited by R. Albajes, M. L. Gullino, J. C. van Lenteren and Y. e. Elad: Dordrecht: Kluwer. Fukasa Akada T., Kung S.-D. and Watson J.C. (1996) Phenylalanine ammonia-lyase gene structure, expression, and evolution in Nicotiana. Plant Molecular Biology 30: 711-722.
- Gabler F.M., Smilanick J.L., Mansour M., Ramming D.W. and Mackey B.E.** (2003) Correlations of morphological, anatomical, and chemical features of grape berries with resistance to *Botrytis cinerea*. Phytopathology 93: 1263-1273.
- Galet P.** (1977) Les Maladies et Les Parasites de La Vigne. Tome I, Imprimerie du Paysan du Midi, France, pp. 313-360.
- Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinsot B., Wendehenne D. and Pugin A.** (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. Molecular Plant-Microbe Interactions 19: 711-724.
- Gechev T.S., Gadjev I.Z. and Hill J.** (2004) An extensive microarray analysis of AALtoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* brings new insights into the complexity of programmed cell death in plants. Cell Mol. Life Sci. 61, 1185-1197.
- Georgakopoulos D., Henderson M., Panopoulos N.J. & Schroth M.N.** (1994) Cloning of a phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 and analysis of its expression *in vitro* with the ice nucleation reporter gene. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2931-2938.
- Gerber I.B., Zeidler D., Durner J. and Dubery I.A.** (2004) Early perception responses of *Nicotiana tabacum* cells in response to lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. Planta 218: 647-657.
- Getha K., Vikineswary S., Wong W.H., Seki T., Ward A., Goodfellow M.** (2005) Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of Fusarium wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 32, 24-32.
- Gilbert J., Jordan M., Somers D.J., Xing T. and Punja Z.K.** (2006) Engineering plants for durable disease resistance. In: Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants (Tuzun S. and Bent E., eds), Springer Science+Business Media, New York, United States of America, pp. 225-258.
- Glick B.R.** (1995) The Enhancement of Plant-Growth by Free-Living Bacteria. Can. J. Microbiol. 41, 109-117.
- Goodfellow M., Williams S.T.** (1983) Ecology of actinomycetes, Annu. Rev. Microbiol. 37, 189-216.

- Goodfellow M., Cross T.** (1984) Classification. In “The Biology of the Actinomycetes” Goodfellow M., Modarski M. & Williams S.T, Eds. Academic Press, London, p.164.
- Goodfellow M., Minnikin D.E.** (1985) Chemical methods in bacterial systematics, Academic Press, London, pp: 173-199.
- Goodfellow M., Stackebrandt E., Koppenstedt M.** (1988) Chemotaxonomy and actinomycetes systematics. In “Biology of Actinomycetes’88” Okami Y., Beppu T. & Ogawara H. Ed., Tokyo: Japan. Scientific Societies Press., pp: 233-238.
- Grant J.J. and Loake G.J.** (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology* 124: 21-29.
- Gray E.J. and Smith D.L.** (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 395-412.
- Gundliffe E.** (2006) Antibiotic production by actinomycetes: the Janus faces of regulation. *J. Ind Microbiol Biotechnol.* 33: 500-6.
- Haas D. and Defago G.** (2005) Biological control of soil-borne pathogens by *fluorescent pseudomonads*. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(4):307-319.
- Hahn H., Huth W., Schöb W. and Diepenbrock W.** (2003) Detection of endophytic fungi in *Festuca* spp. by means of tissue print immunoassay. *Plant Breeding* 122: 217-223.
- Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W.F. and Kloepper J.W.** (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 895-914.
- Hallmann J.** (2001) Plant interactions with endophytic bacteria. In: *Biotic Interactions in Plant-Pathogen Associations* (Jeger M.J. and Spence N.J., eds), CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom, pp. 87-119.
- Hameeda B., Rupela O.P., Reddy G., Satyavani K.** (2006) Application of plant growthpromoting bacteria associated with composts and macrofauna for growth promotion of Pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.). *Biol. Fertil. Soils* 43, 221–227.
- Hamill J.D.** (1993) Alterations in auxin and cytokinin metabolism of higher plants due to expression of specific genes from pathogenic bacteria: a review. *Aust. J. Plant Physiol.* 20, 405–423.
- Hammerschmidt R.** (1999) Phytoalexins: what we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology* 37: 285-306.
- Hammerschmidt R., Métraux J.-P. and van Loon L.C.** (2001) Inducing resistance: a summary of papers presented at the first international symposium on induced resistance to plant diseases, Corfu, May 2000. *European Journal of Plant Pathology* 107: 1-6.

- Hammond-Kosack and Jones J.D.G.** (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8: 1773-1791.
- Handelsman J., Stabb E.V.** (1996) Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* 8, 1855-1855.
- Harman G.E.** (2006) Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96: 190-194.
- Harman G.E., Howell C.R., Vitarbo A., Chet I. and Lorito M.** (2004) *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology* 2: 43-56.
- Hartmann A.** (2005) Prof. Dr. Lorenz Hiltner, a pioneer in soil bacteriology and rhizosphere research. In: *Rhizosphere 2004: Perspectives and Challenges – A Tribute to Lorenz Hiltner* (Hartmann A., Schmid M., Wenzel W. and Hinsinger P., eds), GSF-Forschungszentrum, Neuherberg, Germany, pp. 1-4.
- Hellman E.W.** (2003) Grapevine structure and function. In: *Oregon Viticulture* (Hellman E.W., ed), Corvallis: Oregon State University Press, United States of America, pp. 5-19.
- Hill G., Stellwaag-Kittler F., Huth G. and Schlosser E.** (1981) Resistance of grapes in different developmental stages to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology Z* 102: 328-338.
- Hinsinger P. and Marschner P.** (2006) Rhizosphere—perspectives and challenges—a tribute to Lorenz Hiltner 12–17 September 2004- Munich, Germany. *Plant and Soil* 283: vii–viii.
- Hoffmann-Sommergruber K.** (2002) Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochemical Society Transactions* 30: 930-935.
- 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.
- Hu X. and Reddy A.S.N.** (1997) Cloning and expression of a PR-5-like protein from *Arabidopsis*: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. *Plant Molecular Biology* 34: 949-959.
- Hu X., Bidney D.L., Yalpani N., Duvick J.P., Crasta O., Folkerts O. and Lu G.** (2003) Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiology* 133: 170-181.
- Huglin P. and Schneider C.** (2003) Biologie et écologie de la vigne. 2ème édition Lavoisier, Paris, France, pp. 1-370.
- Hayashi K., Nozaki H.** (1999) Kitamycins, new antimycin antibiotics produced by *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* 52, 325-328.

- Hopwood D.A., Bibb J.M., Chater K.F., Kieser T., Bruton C.J., Kieser H.M., Lydiate D.J., Smith C.P., Ward J.M., Schrempf H.** (1985) Genetic manipulation of Streptomyces: a laboratory manual. John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
- Indiragandhi P., Anandham R., Madhaiyan M., Sa T.M.** (2008) Characterization of plant growth promoting traits of bacteria isolated from larval guts of diamondback moth *Plutellaxylostella* (Lepidoptera: Putellidae). *Curr. Microbiol.* DOI 10.1007/s00284-007-90864.
- Ikeda T.** (2003) Pharmacological effects of ivermectin, an antiparasitic agent for intestinal strongyloidiasis: its mode of action and clinical efficacy. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 122, 527-538.
- Isono K., Nagatsu J., Kobinata K., Sasaki K., Suzuki S.** (1965) Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. Part I. Isolation and characterization of polyoxins A and B. *Agricul. Biol. Chem.* 29, 848-854.
- Iwasa T., Yamamoto H., Shibata M.** (1970) Studies on validamycins, new antibiotics. I. *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus* nov, validamycin-producing organism. *J. Antibiot.* 23, 595-602.
- Jacobs A.K., Dry I.B. & Robinson S.P.** (1999) Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with etephon. *Plant*
- Jain P.K., Jain P.C.** (2007) Isolation, characterization and antifungal activity of *Streptomyces sampsonii* GS 1322. *Indian J. Exp. Biol.* 45, 203-206.
- Jeandet P., Bessis R. and Gautheron B.** (1991) The production of resveratrol (3,5,4-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *American Journal of Enology and Viticulture* 42: 41-46.
- Jeandet P., Vasserot Y., Marchal R., Maujean A., Adrian M. Breuil A.-C. and Bessis R.** (1999) Interaction entre la vigne et *Botrytis cinerea* : aspects phytopathologiques et oenologiques (Interaction between grapevine and *Botrytis cinerea*: phytopathological and enological aspects). *Revue Française d'Oenologie* 177: 19-22.
- Jeandet P., Jacquot C., Parmentier M., Conreux A., Sbaghi M., Adrian M. and Waffo-Téguo P.** (2007). Role of stilbene dehydrodimers (viniferins) in the *Botrytis cinerea*/grapevine interaction. In: *Macromolecules and Secondary Metabolites of Grapevine and Wine* (Jeandet P., Clément C. and Conreux A., eds), Lavoisier, Paris, France, pp. 105-110.
- Jiang Y., Li W.J., Xu P., Tang S.K., Xu L.H.** (2005) Study on diversity of Actinomycetes salt and alkaline environments. *Wei Sheng Wu Xue Bae* 46, 191–195.

- Jones J.D. and Dangl J.L.** (2006) The plant immune system. *Nature* 16: 323-329.
- Kachroo A. and Kachroo P.** (2007) Salicylic acid-, jasmonic acid- and ethylene-mediated regulation of plant defense signaling. In: *Genetic Engineering, Principles and Methods* (Setlow J., ed), Springer, Heidelberg, Germany, 28: 55-83.
- Kahkonen M.A., Tuomela M., Hatakka A.** (2006) Microbial activities in soils of a former sawmill area. *Chemosphere* doi:10.1016/j.chemosphere 09.053.
- Kalakoutski L.V., Agre N.S.** (1976) Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol. Rew.* 40, 469-525.
- Keen N.T.** (1992) The molecular biology of disease resistance. *Plant Mol. Biol.* 19: 109-122.
- Keen N.T., Ersek T., Long M., Bruegger B. & Holliday M.** (1981) Inhibition of the hypersensitive reaction of soybean leaves to incompatible *Pseudomonas spp.* by blasticidin S, streptomycin or elevated temperature. *Physiol. Plant Pathol.* 18: 325–337.
- Keller M., Viret O. and Cole F.M.** (2003) *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: defense reaction, latency, and disease expression. *Phytopathology* 93: 316-322.
- Khan N.I., Filonow A.B., Singleton L.L.** (1997) Augmentation of soil with sporangia of *Actinoplanes spp.* for biological control of Pythium damping-off. *Biocontrol Science and Technology* 7, 11-22.
- Khan M.S., Zaidi A.** (2007) Synergistic effects of the inoculation with plant growth promoting rhizobacteria and an arbuscular mycorrhizal fungus on the performance of wheat. *Turk. J. Agric. For.* 31, 355-362.
- Kikkert J., Ali G.S., Striem M.J., Martens M., Wallace P.G., Molino L. and Reisch B.I.** (1997) Genetic engineering of grapevine (*Vitis sp.*) for enhancement of disease resistance. *Acta Horticulturae* 447: 273-279.
- Klarzynski O., Plesse B., Joubert J.M., Yin J.C., Kopp M., Kloareg B. and Fritig B.** (2000) Linear β -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology* 124: 1027-1037
- Kloepper J.W. and Schroth M.N.** (1978) Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, vol. II (Station de Pathologie Végétale et Phyto-Bactériologie, ed), Gilbert-Clarey, Tours, France, pp. 879-882.
- Kloepper J.W., Scher F.M., Laliberte M. and Tipping B.** (1986) Emergence-promoting rhizobacteria: description and implications for agriculture. In: *Iron, Siderophores and Plant Diseases* (Swinburne T.R., ed), Plenum, Publishing Corporation, New York, United States of America, pp. 155-164.

Kloepfer J.W., Tuzun S. and Kuć J.A. (1992) Proposed definitions related to induced disease resistance. Biocontrol Science and Technology 2: 349-351.

Kouassi M. (2001). La lutte biologique: une alternative *viable* à l'utilsation des pesticides? VertigO. 2 (2).

Lagrimini L.M., Burkhart W., Moyer M. and Rothstein S. (1987) Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84: 7542-7546.

Lam E. (2004). Controlled cell death, plant survival and development. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5:305-315.

Lam E., Kato N. and Lawton M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. Nature. 411: 848-853.

Lamattina L., Garcia-Mata C., Graziano M. and Pagnussat G. (2003) Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule. Annual Review in Plant Biology 54: 109-136.

Lamotte O., Courtois C., Barnavon L., Pugin A. and Wendehenne D. (2005) Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signaling properties of a fascinating molecule. Planta 221:1-4.

Lechevalier H.A., Lechevalier M.P. (1965) Classification des actinomycètes aérobies basée sur leur morphologie et leur composition chimique. Ann. Inst. Pasteur. 108, 662-673.

Lechevalier H.A., Lechevalier M.P. (1970) A critical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes. In The Actinomycetales. Edited by H. Prauser. Gustav Fischer Verlag GmbH & Co., Jena, Germany. pp. 393–405.

Lechevalier M.P. (1988) Actinomycetes in agriculture and forestry. In “Actinomycetes in Biotechnology”. Goodfellow M.G., Williams S.T. & Modarski M. Ed., Academic Press London, New-York, pp: 327-358.

Lechevalier M.P., Lechevalier, H.A. (1980) The chemotaxonomy of actinomycetes. In Actinomycetes Taxonomy: Society for Industrial Microbiology Special Publication Number A6, eds Dietz, A. & Thayer, D.W. pp. 225-292. Arlington, Virginia Society of Industrial Microbiology.

Lee J.P., Lee S.W., Kim C.S., Son J.H., Song J.H., Lee K.Y., Kim H.J., Jung S.J. and Moon B.J. (2006) Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. Biol. Control. 37(3):329 337.

- Lee Y.H., Lee W.H., Lee D.K. and Shim H.K.** (2001) Factors relating to induced systemic resistance in watermelon by plant growth-promoting *Pseudomonas* sp. Plant Pathol. J. 17:174- 179.
- Legrand V., Dalmayrac S., Latché A., Pech J.C., Bouzayen M., Fallot J., Torregrosa L., Bouquet A. and Roustan J.P.** (2003) Constitutive expression of *Vr-ERE* gene in transformed grapevine confers enhanced resistance to eutypine, a toxin from *Eutypa lata*. Plant Science 164: 809-814.
- Lehr N.A., Schrey S.D., Hampp R., Tarkka M.T.** (2008) Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. New Phytol. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02322.x.
- Lemriss S., Laurent F., Couble A., Casoli E., Lancelin J.M., Aintpierre-Bonaccio D., Rifai S., Fassouane A., and Boiron P.** (2003) Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. Can. J. Microbiol. 49: 669–674.
- Leroux P.** (2004) Chemical control of Botrytis and its resistance to chemical fungicides. In: Botrytis: Biology, Pathology and Control (Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N., eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 195-222.
- Leroux P.** (2003) Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. Comptes Rendus de Biologie 326: 9-21.
- Leroux P.** (1996) Recent developments in the mode of action of fungicides. Pesticide Science 47: 191-197.
- Leroux P., Chapelard F., Desbrosses D. & Gredt M.** (1999) Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. Crop Protection 18: 687-697.
- Leroux P., Colas V., Fritz R. & Lanen C.** (1995) Interaction of the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil with amino acids and sulfur containing metabolites in *Botrytis cinerea*. Modern fungicides and antifungal compounds - International Symposium 11th, Lyr R, Russel PE & Sisler HD (Eds), Intercept, Andover, Royaume-Uni, 61-67.
- Locci R., Sharples G.P.** (1984) In “The Biology of Actinomycetes” Goodfellow M.G., Williams S.T.& Modarski M. Ed., Academic Press, Orlando, pp: 165-199.
- Lodewyckx C., Vangronsveld J., Porteous F., Moore E.R.B., Taghavi S., Mezgeay M. and van der Lelie D.** (2002) Endophytic bacteria and their potential applications. Critical Review in Plant Science 21: 583-606.

- Lorenzo O., Piqueras R., Sanchez-Serrano J.J. and Solano R.** (2003). Ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*. 15(1):165-178.
- Lourencio Junior V., Maffia L.A., Romeiro R.d.S. and Mizubuti E.S.G.** (2006). Biocontrol of tomato late blight with the combination of epiphytic antagonists and rhizobacteria. *Biol. Control*. 38(3):331-340.
- Mackey D. and McFall A.J.** (2006) MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Molecular Microbiology* 61: 1365-1371.
- Magnin-Robert M., Trotel-Aziz P., Quantinet D., Biagianti S. and Aziz A.** (2007) Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and β -1,3 glucanase activities under field conditions. *European Journal of Plant Pathology* 118: 43-57.
- Mahadevan B., Crawford D.L.** (1996) Purification of chitinase from the biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 489-493.
- Mahadevan B., Crawford D.L.** (1997) Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enz. Microb. Techn.* 20, 489–493.
- Mansfield J.W.** (2000) Antimicrobial compounds and resistance: the role of phytoalexins and phytoanticipins. In *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*, edited by A. J. Slusarenko, R. S. S. Fraser and L. C. Van Loon. Dordrecht: Kluwer. Mauchline T.H., Kerry B.R. and Hirsch P.R. (2002) Quantification in soil and the rhizosphere of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* by competitive PCR and comparison with selective plating. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1846- 1853.
- Mao W., Lewis, A., Lumsden R.D., and Hebbar K.P.** (1998) Biocontrol of selected soilborne diseases of tomato and pepper plants. *Crop Prot.* 17: 535-542.
- Marchal R., Tabary I., Valade M., Moncomble D., Viaux L., Robillard B., Duteubre B. and Jeandet P.** (2002) Influence de la pourriture grise sur les propriétés moussantes des champagnes. *Le Vigneron Champenois* 6: 52-64.
- Martinez C., Baccou J.C., Bresson E., Baissac Y., Daniel J.F. and Jalloul A.** (2000) Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. *Plant Physiol.* 122: 757-766.
- Marois J.J., Nelson J.K., Morrison J.C., Lile L.S. and Bledsoe A.M.** (1986) The influence of berry contact within grape clusters on the development of *Botrytis cinerea* and epicuticular wax. *American Journal of Enology and Viticulture* 37: 293-296.

- Mauch-Mani B. and Mauch F.** (2005) The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 409-414.
- McCully M.E.** (2001) Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 983-990.
- Mehdy M.C.** (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology* 105: 467-472.
- Mellersch D.G., Foulds I.V., Higgins V.J. and Heath M.C.** (2002) H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. *The Plant Journal* 29: 257-268.
- Métraux J.P., Nawrath C. and Genoud T.** (2002) Systemic acquired resistance. *Euphytica* 124: 237-243.
- Meunchang S., Panichsakpatana S., Weaver R.W.** (2006) Tomato growth in soil amended with sugar mill by-products compost. *Plant Soil* 280, 171–176.
- Meyer U.** (2001) Grapevine. In: *Growth Satges of Mono- and Dicotyledonous Plants*, BBCH Monograph (Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, ed), Blackwell Wissenschafts-verlag, Berlin, Germany, pp. 93-95.
- Minuto A., Spadaro D., Garibaldi A. and Gullino M.L.** (2006) Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. *Crop Protect.* 25(5):468-475.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. and van Breusegem F.** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490-498.
- Miyadoh S.** (1993) Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganisms approach. *Actinomycetologica* 7, 100–106.
- Mohamed N., Lherminier J., Farmer M.-J., Fromentin J., Béno N., Houot V., Milat M.-L. and Blein J.-P.** (2007) Defense responses in grapevine leaves against *Botrytis cinerea* induced by application of a *Pythium oligandrum* strain or its elicitin, Oligandrin, to roots. *Phytopathology* 97: 611-620.
- Montalvo N.F., Mohamed N.M., Enticknap J.J., Hill R.T.** (2005) Novel actinobacteria from marine sponges. *Antonie van Leeuwenhoek* 87, 29–36.
- Morandi D.** (1996) Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control. *Plant Soil* 185, 241–251.
- Morel R.** (1996) Les sols cultivés. 2e edition Lavoisier, Paris.
- Mullins M.G., Bouquet A. and Williams L.E.** (1992) Biology of the grapevine. In: Mullins M.G., ed, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, pp. 1-239.

- Mur L.A., Kenton P., Atzorn R., Miersch O. and Wasternack C.** (2006) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol.* 140:249-262.
- Murray R.G.E., Brenner D.J., Holt J.G., Krieg N.R., Mulder J.W., Pfenning N., Sneath P.H., Stoley J.T., Williams S.T.** (1989) In 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'. Williams et Wilkins Eds. Vol. 4, pp : 2333-2648.
- Nair N.G., Guilbaud Oulton S., Barchia I. and Emmett R.** (1995) Significance of carry over inoculum, flower infection and latency on the incidence of *Botrytis cinerea* in berries of grapevines at harvest in New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 35: 1177-1180.
- Nappi P., Jodice R., Luzzati A. and Corino L.** (1985) Grapevine root system and vesiculararbuscular mycorrhizae in some soils of Piedmont (Italy). *Plant and Soil* 85: 205-210.
- Nawrath C., Métraux J.P. and Genoux T.** (2006) Chemical signals in plant resistance: salicylic acid. In: Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants (Tuzun S. and Bent E., eds), Springer Science+Business Media, New York, United States of America, pp. 143-165.
- Niderman T., Genetet I., Bruyere T., Gees R., Stintzi A., Legrand M., Fritig B. and Mössinger E.** (1995) Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal - Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology* 108: 17-27.
- Niki T., Mitsuhara I., Seo S., Ohtsubo N. and Ohashi Y.** (1998) Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiology* 39: 500-507.
- Noel G.M.A.M., Madrid E.A., Bottini R., Lamattina L.** (2001) Indole acetic acid attenuates disease severity in potato-*Phytophthora infestans* interaction and inhibits the pathogen growth *in vitro*. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 815-823.
- Nonomura H.** (1974) Key for classification and identification of 485 species of the Streptomyces included in the ISP. *J Ferment Technol* 52:78-92.
- Nonomura H., Hayakawa M.** (1988) New methods for selective isolation of soil actinomycetes. In: Okami Y, Beppu T, Ogawara H,(eds) *Biology of Actinomycetes*. pp. 288-293. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, ISBN 4-7622-1552-X.

- Nowak J., Asiedu S.K., Lazarovits G., Pillay V., Stewart A., Smith C. and Liu Z.** (1995) Enhancement of *in vitro* growth and transplant stress tolerance of potato and vegetable plantlets co-cultured with a plant growth-promoting rhizobacterium. In: Proceedings of the International Symposium on Ecophysiology and Photosynthetic *In Vitro* Cultures (Carré F. and Chagvardieff P., eds), CEA, Aix-en-Provence, France, pp. 173-180.
- Nozue M., Tomiyama K. & Doke N.** (1977) Effect of blasticidin S on development of potential of potato tuber cells to react hypersensitively to infection by *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant Pathol.* 10: 181–189.
- Nürnberg T. and Brunner F.** (2002) Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 318-324.
- O'Donnell A.G.** (1988) Recognition of novel actinomycetes. In “Actinomycetes in Biotechnology”. Goodfellow M. G., Williams S.T. & Modarski M. Ed., Academic Press London, New-York, pp: 360-432.
- Okami Y., Hotta K.** (1988) Search and Discovery of new antibiotics. In ‘Actinomycetes in Biotechnology’. Goodfellow M. G., Williams S. T. et Modarski M. Ed., Academic Press London, New- York, pp : 33-68.
- Omura S., Enomoto Y., Shinose M., Takahashi Y., Iwai Y., Shiomi K.** (1999) Isolation and structure of a new antibiotic Viridomycin F produced by *Streptomyces* sp. K96-01 88. *J. Antibiot.* 52, 61-64.
- Ongena M., Duby F., Rossignol F., Fouconnier M. L., Dommes J. and Thonart P.** (2004) Stimulation of the lipoxygenase pathway is associated with systemic resistance induced in bean by a nonpathogenic *Pseudomonas* strain. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 1009-1018.
- Ouhdouch Y., Barakate M., Finance C.** (2001) Actinomycetes of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. *Eur. J. Soil Biol.* 37, 69–74.
- Ownley B.H., Weller D.M. & Thomashow L.S.** (1992) Influence of in situ and *in vitro* pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Phytopathology* 82: 178–184.
- Paiva N.L.** (2000) An introduction to the biosynthesis of chemicals used in plant microbe communication. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 131-143.
- Pandey A., Trivedi P., Kumar B., Palni L.M.S.** (2006) Characterization of a phosphate solubilizing and antagonistic strain of *Pseudomonas putida* (B0) isolated from a sub-alpine location in the Indian central Himalaya. *Curr. Microbiology* 53 : 102-107.

- Panon M.L., Panigai L., Walker A.-S. and Leroux P.** (2006) Les nouveautés concernant la pourriture grise : en quelques points. Le Vigneron Champenois 127: 26-36.
- Park D.H., Kim J.S., Kwon S.W., Wilson C., Yu Y.M., Hur J.H., Lim C.K.** (2003) *Streptomyces luridiscabiei* sp. nov., *Streptomyces puniciscabiei* sp. nov. and *Streptomyces niveiscabiei* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea. Int J Syst Evol Microbiol. 53, 2049-2054.
- Park K. S. and Kloepper J.W.** (2000) Activation of PR-1a promoter by rhizobacteria that induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Biol. Control. 18(1):2-9.
- Parke J.L.** (1991) Root colonization by indigenous and introduced microorganisms. In: The Rhizosphere and Plant Growth (Keister D.L. and Gregan P.B., eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 33-42.
- Parker J.E.** (2003) Plant recognition of microbial patterns. Trends Plant Sci. 8(6):245-247.
- Paulitz T.C. and Bélanger R.R.** (2001) Biological control in greenhouse systems. Annu. Rev. Phytopathol. 39:103-133.
- Pathom-Aree W., Stach J.E., Ward A.C., Horikoshi K., Bull A.T., Goodfellow M.** (2006) Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. Extremophiles 10, 181-189.
- Pawlowski K., Sirrenberg A.** (2003) Symbiosis between Frankia and actinorhizal plants: root nodules of non-legumes. Indian J. Exp. Biol. 41, 1165-83.
- Percival D.C., Sullivan J.A. and Fisher K.H.** (1993) Effect of cluster exposure, berry contact and cultivar on cuticular membrane formation and occurrence of bunch rot (*Botrytis cinerea* Pers. Fr.) with 3 *Vitis vinifera* L. cultivars. Vitis 32: 87-97.
- Pezet R. & Pont V.** (1992) Differing biochemical and histological studies of two grape cultivars in the view of their respective susceptibility and resistance to *Botrytis cinerea*. In Recent advances in Botrytis research, Verhoeff K, Malathrakis E & Williamson B (Eds), Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, Pays-Bas, 93-98.
- Pezet R.** (1993) La pourriture grise des raisins, le complexe plante-parasite. Le Vigneron Champenois 5: 65-77.
- Pezet R.** (1996) Mise en évidence d'une activité cutinololitique dans les spores de *Botrytis cinerea* et conséquences épidémiologiques. Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture & Horticulture 28(2): 103.
- Pezet R., Viret O. and Gindro K.** (2004) Plant-microbe interaction: the Botrytis grey mould of grapes-biology, biochemistry, epidemiology and control management. In: Advances in

Plant Physiology (Hemantaranjan A., ed), Scientific publishers, Jodhpur, India, 7: 71-116.

Pieterse C.M.J., van Wees S.C.M., Hoffland E., van Pelt J.A. and van Loon L.C. (1996) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis related gene expression. *The Plant Cell* 8: 1225-1237.

Pieterse C.M.J., van der Ent S., van Pelt J.A. and van Loon L.C. (2007) The role of ethylene in rhizobacteria-induced systemic resistance (ISR). In: *Plant Hormone Ethylene: Proceedings of the 7th International Symposium* (Ramina A., ed), Springer, Dordrecht, The Netherlands, sous presse.

Pieterse C.M.J. and van Loon L.C. (2007) Signalling cascades in induced resistance. In: *Induced Resistance for Plant Defense: A Sustainable Approach to Crop Protection* (Walters D., Newton A. and Lyon G., eds), Blackwell, Oxford, United Kingdom, pp. 65-68.

Planchon J.E. (1887) Monographie des Ampélideae vraies. *Monographia Phanerogamerum* 5: 305-364.

Poinssot B., Vandelle E., Bentéjac M., Adrian M., Levis C., Brygoo Y., Garin J., Sicilia F., Coutos-Thévenot P. and Pugin A. (2003) The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 553-564.

Pozo M.J., Azcón-Aguilar C., Dumas-Gaudot E. and Barea J.M. (1999) β -1,3-glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. *Plant Science* 141: 149-157.

Pozo M.J., Cordier C., Dumas-Gaudot E., Gianinazzi S., Barea J.M. and Azcon-Aguilar C. (2002) Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 525-534.

Prats E., Mur L.A.J., Sanderson R. and Carver T.L.W. (2005) Nitric oxide contributes both to papilla-based resistance and the hypersensitive response in barley attacked by *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei*. *Molecular Plant Pathology* 6: 65-78.

Prauser H. (1981) Nocardiform organisms: general characterization and taxonomic relationships. *Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. Suppl.* 11, 17-24.

Prévost K., Couture G., Shipley B., Brzezinski R., Beaulieu C. (2006) Effect of chitosan and a biocontrol streptomycete on field and potato tuber bacterial communities. *Biocontrol* 51, 533-546.

Punja Z.K. (2001) Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens-a review of progress and future prospects. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 216-235.

- Raaijmakers J.M., Vlami M., Jorge T.** (2002) Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 537–547.
- Rahman M.S., Ano T. and Shoda M.** (2007) Biofilm fermentation of iturin A by a recombinant strain of *Bacillus subtilis* 168. *J. Biotechnol.* 127(3):503-507.
- Ramamoorthy V., Viswanathan R., Raguchander T., Prakasam V. and Samiyappan R.** (2001) Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protect.* 20(1):1-11.
- Ren D., Yang H. and Zhang S.** (2002) Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxidase production in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277(1):559-565.
- Renault A.S., Deloire A. and Bierne J.** (1996) Pathogenesis-related proteins in grapevines induced by salicylic acid and *Botrytis cinerea*. *Vitis* 35: 49-52.
- Repka V., Kubikova J. and Fischerova I.** (2000) Immunodetection of PR-1-like proteins in grapevine leaves infected with Oidium tuckeri and in elicited suspension cell cultures. *Vitis* 39: 123-127.
- Repka V., Fischerova I. and Silharova K.** (2001) Biological activity of the elicitor released from mycelium of a grapevine isolate of the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Vitis* 40: 205-212.
- Repka V.** (2006) Early defence responses induced by two distinct elicitors derived from a *Botrytis cinerea* in grapevine leaves and cell suspensions. *Biologia Plantarum* 50: 94-106.
- Reyes M.E.Q., Rohrbach K.G. and Paull R.E.** (2004) Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 33(2):193-203.
- Reynier A.** (1989) In *Manuel de viticulture*, 5ème édition. Baillière JB (Ed), Lavoisier, Paris, France, 406 p.
- Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H.Y. & Hunt M.D.** (1996) Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8: 1809-1819.
- Ryan C.A.** (1990) Protease inhibitors in plant: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 28: 425-449.
- Ryan F.J., Omer A.D., Aung L.H. & Granett J.** (2000) Effects of infestation by grape phylloxera on sugars, free amino acids, and starch of grapevine roots. *Vitis* 39(4): 175-176.
- Rybka K., Arseniuk E., Wiśniewska J. & Raczyńska-Bojanowska K.** (1998) Comparative studies of the activities of chitinase, β-1,3-glucanase, peroxidase and phenylalanine ammonia lyase in the leaves of triticale and wheat infected with *Stagonospora nodorum*. *Acta Physiologiae Plantarum* 20(1): 59-66.

- Ryu C.M., Murphy J.F., Mysore K.S. and Kloepper J.W.** (2004) Plant growth-promoting rhizobacterial systemically protect *Arabidopsis thaliana* against Cucumber mosaic virus by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. *The Plant Journal* 39: 381-392.
- Sabaou N., Boudjella H., Bennadi A., Lamari A.L, Bennadi H.** (1998) Les sols des oasis du sahara algérien sources d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sechresse* 9:47-53.
- Sachetto-Martins G., Franco L.O. and de Oliveira D.E.** (2000) Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochemistry and Biophysica Acta* 21: 1-14.
- Saikkonen K., Faeth S.H., Helander M. and Sullivan T.J.** (1998) Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 319-343.
- Salzman R.A., Tikhonova I., Bordelon B.P., Hasegawa P.M. & Bressan R.A.** (1998) Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiology* 117: 465-472.
- Samadi L. & Behboodi S.B.** (2006) Fusaric acid induced apoptosis in saffron root-tip cells: roles of caspase-like activity, cytochrome c, and H₂O₂. *Planta*.
- Saravanakumar D., Vijayakumar C., Kumar N. and Samiyappan R.** (2007) PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease. *Crop Protect.* 26(4):556-565.
- Sardi P., Saracchi M., Quaroni S., Petrolini B., Borgonovi G.E., Nesli S.** (1992) Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. *Appl Environ. Microbiol.* 58:2691-2698.
- Schardl C.L., Leuchtmann A. and Spiering M.J.** (2004) Symbioses of grasses with **Schrempf H.** (2001) Recognition and degradation of chitin by streptomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek* 79, 285–289.
- Schottel J.L., Shimizu K., Kinkel L.L.** (2001) Relationships of *in vitro* pathogen inhibition and soil colonization to potato scab biocontrol by antagonistic *Streptomyces* spp. *Biol. Control* 20, 102–112.
- Schroth M.N. and Hancock J.G.** (1981) Selected topics in biological control. *Annual Review in Microbiology* 35: 453-476.
- Selosse M.A., Baudoïn E. and Vandenkoornhuyse P.** (2004) Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes Rendus de Biologie* 327: 639-648.

- Seppänen S.K., Syrjälä L., von Weissenberg K., Teeri T.H., Paajanen L. and Pappinen A.** (2004) Antifungal activity of stilbenes *in vitro* bioassays and in transgenic *Populus* expressing a gene encoding pinosylvin synthase. *Plant Cell Reports* 22: 584-593.
- Serazetdinova L., Oldach K.H. and Lörz H.** (2005) Expression of transgenic stilbene synthases in wheat causes the accumulation of unknown stilbene derivatives with antifungal activity. *Journal of Plant Physiology* 162: 985-1002.
- Shah D.M. (1997) Genetic engineering for fungal and bacterial diseases. *Current Opinion in Biotechnology* 8: 208-214.
- Shartz A., Bugie E., Waksman S.A.** (1944) Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 55, 66-69.
- Shih H.D., Liu Y.C., Hsu F.L., Mulabagal V., Dodda R., Huang J.W.** (2003) Fungichromin: A substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizoctonia solani*. *J. Agric. Food Chem.* 51, 95-99.
- Shirling E.B., Gottlieb D.** (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst. Bacteriol.* 16:313-340.
- Shoresh M., Yedidia I. and Chet I.** (2005) Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95: 76-84.
- Sinclair J.B. and Cerkauskas R.F.** (1996) Latent infection vs endophytic colonization by fungi. In: Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants. Systematics, Ecology and Evolution (Redlin S.C. and Carris L.M., eds), APS press, Saint Paul, United States of America, pp. 3-29.
- Singh A., Mehta S., Singh H.B. & Nautiyal C.S.** (2003) Biocontrol of Collar Rot Disease of Betelvine (*Piper betle* L.) Caused by *Sclerotium rolfsii* by Using Rhizosphere-Competent *Pseudomonas fluorescens* NBRI-N6 and *P. fluorescens* NBRI-N. *Cur. Microbiol.* 47: 153-158.
- Singh C.P., Amberger A.** (1998) Organic acids and phosphorus solubilization in straw composted with rock phosphate. *Biorource Technology* 68, 13-16.
- Singh P.P., Shin Y.C., Park C.S. & Chung Y.R.** (1999) Biological control of Fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* 89: 92–99.
- Singh SK, Sharma HC, Goswami AM, Datta SP & Singh SP** (2000) *In vitro* growth and leaf composition of grapevine cultivars as affected by sodium chloride. *Biologia Plantarum*. 43(2): 283-286.

- Smith R.M., Peterson W.H., McCo, E.** (1954) Oligomycin, a new antifungal antibiotic. *Antibiot. Chemother.* 4: 962–970.
- Smith J., Putnam A., Nair M.** (1990) *In vitro* control of Fusarium diseases of *Asparagus officinalis* L. with a Streptomyces or its Polyene Antibiotic, Faeriefungin. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1729-1733.
- Soares A.C.F., Sousa C.S., Garrido M.S., Perez J.O., Almeida N.S.** (2006) Soil Streptomycetes with *in vitro* activity against the yam pathogens *Curvularia eragrostides* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:456-461.
- Sontag B., Gerlitz M., Paululat T., Rasser H.F., Grün-Wollny I., Hansske F.G.** (2006) Oxachelin, a Novel Iron Chelator and Antifungal Agent from *Streptomyces* sp. GW9/1258. *J. Antibiot.* 59, 659–663.
- Sørensen J. and Sessitsch A.** (2006) Plant-associated bacteria-lifestyle and molecular interactions. In: Modern Soil Microbiology, 2nd edition (van Elsas J.D., Trevors J.T. and Jansson J.K., eds), CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, United States of America, pp. 211-236.
- Spadaro D. & Gullino M. L.** (2004) Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Prot.* 23: 1-13.
- Sprent J.I. and James E.K.** (1995) N2-fixation by endophytic bacteria: questions of entry and operation. In: Azospirillum VI and Related Microorganisms (Fendrik I., del Gallo, M., Vanderleyden J. and de Zamaroczy M., eds), Springer, Berlin, Germany, pp. 15-30.
- Stackebrandt E., Rainey F.A., Ward-Rainey N.L.** (1997) Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria classis nov. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 47, 479–491.
- Stamler J.S., Lamas S. and Fang F.C.** (2001) Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106: 675-683.
- Sticher L., Mauch-Mani B. and Métraux J. P.** (1997) Systemic acquired resistance. *Annu Rev. Phytopathol.* 35:235-270.
- Stirpe F., Barbieri L., Battelli M.G., Soria M. and Lappi D.A.** (1992) Ribosome inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Bio/Technology* 10: 405-412.
- Stöhr C. and Stremlau S.** (2006) Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany* 57: 463-470.
- Struyk A.P., Hoette I., Drost G., Waisvisz J.M., van Eek T., Hoogerheide J.C.** (1958) Pimaricin, a new antifungal antibiotic. In: Antibiotics Annual 1957-1958 (H. Welch and F. Marti- Ibanez, eds.), pp. 878-885. Medical Encyclopedia, Inc., New York.

- Strzelczyk E., Leniarska V.** (1985) Production of B group vitamins by mycorrhizal fungi and actinomycetes isolated from the root zone of pine (*Pinus silvestris* L.). *Plant Soil* 86, 387-394.
- Sturz A.V. and Christie B.R.** (2003) Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. *Soil and tillage research* 72: 107-123.
- Sturz A.V., Christie B.R. and Nowak J.** (2000) Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Review in Plant Science* 19: 1-30.
- Tahiri-Alaoui A., Dumas-Gaudot E. and Gianinazzi S.** (1993) Immunocytochemical localization of pathogenesis-related PR-1 proteins in tobacco root tissues infected *in vitro* by the black root rot fungus Chalara elegans. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42: 69-82.
- Tahvonen R.** (1988) Microbial control of plant diseases with *Streptomyces* spp. *EPPO Bulletin* 18, 55-59.
- Tahvonen R.T., Avikainen H.** (1987) The biological control of seed-borne *Alternaria brassicicola* of cruciferous plants with a powdery preparation of *Streptomyces* sp. *J. Agric. Sci. Finland* 59, 199–208.
- Thakore Y.** (2006) The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*. 2(3):294-208.
- Thomashow L.S.** (1996) Biological control of plant root pathogens. *Current Opinion in Biotechnology* 7: 343-347.
- Ton J., Pieterse C.M.J. and van Loon L.C.** (2006) The relationship between basal and induced resistance in *Arabidopsis*. In: *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants* (Tuzun S. and Bent E., eds), Springer Science+Business Media, New York, United States of America, pp. 197-224.
- Tokala R.K., Strap J.L., Jung M.C., Crawford D.L., Salove M.H., Deobald L.A., Bailey F.J., Morra M.J.** (2002) Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2161-2171.
- Ton J., van der Ent S., van Hulsen M., Pozo M., van Oosten V., van Loon L.C., Mauch-Mani B., Turlings T.C.J. and Pieterse C.M.J.** (2007) Priming as a mechanism behind induced resistance against pathogens, insects and abiotic stress. In: *Breeding for Inducible Resistance Against Pests and Diseases* (Mauch-Mani B., Dicke M. and Schmidt A., eds), IOBC/WPRS Bulletin.

- Torres M.A. and Dangl J.L.** (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 397-403.
- Torres M.A., Dangl J.L. and Jones J.D.G.** (2002) Arabidopsis gp91(phox) homologues Atbhd and Atbhf are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 517-522.
- Trejo-Estrada S.R., Paszczynski A., Crawford D.L.** (1998) Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. *J. Industr. Microbiol. Biotech.* 21, 81-90.
- Tsahouridou, P.C. & Thanassoulopoulos C.C.** (2002) Proliferation of *Trichoderma koningii* in the tomato rhizosphere and suppression of damping-off causing by *Sclerotium rolfsii*. *Soil Bochem.* 34: 767-776.
- Tsahouridou P.C. & Thanassoulopoulos C.C.** (2001) *Trichoderma koningii* as a potential parasite of sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. *Cryptogamie Mycol.* 22: 289-295.
- Tuzun S.** (2006) Terminology related to induced systemic resistance: incorrect use of synonymous may lead to a scientific dilemma by misleading interpretation of results. In: Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants (Tuzun S. and Bent E., eds), Springer Science+Business Media, New York, United States of America, pp. 1-8.
- Tuzun S. and Somanchi A.** (2006) The possible role of PR proteins in multigenic and induced systemic resistance. In: Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants (Tuzun S. and Bent E., eds), Springer Science+Business Media, New York, United States of America, pp. 112-142.
- Umezawa H., Okami Y., Hashimoto T., Suhara Y., Hamada M., Takeuchi T.** (1965) A new antibiotic, Kasugamycin. *J. Antibiot.* 18, 101-3.
- Union des Industries pour la Protection des Plantes** (2001) <http://www.uipp.org>
- Vail M.E. and Marois J.J.** (1991) Grape cluster architecture and the susceptibility of berries to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 81: 188-191.
- Valdebenito M., Crumbliss A.L., Winkelmann G. and Hantke K.** (2006) Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin and yersiniabactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Int. J. Med. Microbiol.* 296(8):513-520.
- Vallad G.E. and Goodman R.M.** (2004) Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science* 44: 1920-1934.

- Valois D., Fayad K., Barasubye T., Garon M., Déry C., Brezezinki R., Beaulieu C.** (1996) Glucanolytic actinomycetes antagonistic to Phytophthora fragariae var. rubi the causal agent of Raspberry Root rot. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1630-1635.
- Valueva T.A., Mosolov V.V.** (2004) Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochem.* 69, 1305-1309.
- Vandelle E., Poinsot B., Wendehenne D., Bentéjac M. and Pugin A.** (2006) Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogenactivated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 429-440.
- van der Hoorn R.A.L., De Wit P.J.G.M. and Joosten M.H.A.J.** (2002) Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends in Plant Science* 7: 67-71.
- van Etten H.D., Mansfield J.W., Bailey J.A. and Farmer E.E.** (1994) Letter to the editor. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus “phytoanticipines”. *The Plant Cell* 6: 1191-1192.
- van Loon L.C.** (2007) Plant responses to plant growth promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, in press.
- van Loon L.C. and Bakker P.A.H.M.** (2005) Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In: PGPR: Biocontrol and Biofertilization (Siddiqui Z.A., ed.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 39-66.
- van Loon L.C. and Bakker P.A.H.M.** (2004) Signalling in rhizobacteria-plant interactions. In: Ecological Studies, vol. 168, Root Ecology (de Kroon J. and Visser E.J.W., eds.), Springer Verlag, Berlin, Germany, pp. 287-330.
- van Loon L.C., Bakker P.A.H.M. and Pieterse C.M.J.** (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36: 453-483
- van Loon L.C., Geraats B.P.J. and Lindthorst H.J.M.** (2006a) Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* 11: 184-191.
- van Loon L.C., Rep M. and Pieterse C.M.J.** (2006b) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162.
- van Peer R. and Schippers B.** (1992) Lipopolysaccharides of plant-growth promoting *Pseudomonas* sp. strain WCS417r induce resistance in carnation to Fusarium wilt. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 98: 129-139.
- van Wees S., Pieterse C., Trijssenaar A., Van't Westende Y., Hartog F. and van Loon L.C.** (1997) Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10: 716-724.

- van Wees S.C.M., Luijendijk M., Smoorenburg I., van Loon L.C. and Pieterse C.M.J.** (1999) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes, but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Molecular Biology* 41: 537-549.
- Vassilev N., Nikolaeva I., Vassileva M.** (2005) Biocontrol properties of microbially-treated sugar beet wastes in presence of rock phosphate. *J Biotechnol.* 1 :118-177.
- Vassilev N., Nikolaeva I., Vassileva M.** (2006a) Phosphate ore solubilization and simultaneous indole-3-acetic acid production by a gel-entrapped bacterium in fermentation conditions. *Chem. Eng. Commun.* (in press).
- Vassilev N., Vassileva M., Nikolaeva I.** (2006b) Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71 : 137-144.
- Vercesi A., Volpi E., Locci R.** (1990) Preliminary investigations on the *Streptomyces* flora of grapevine berries. *Actinomycetes* 1: 7-9.
- Vercesi A., Volpi E., Locci R.** (1991) On the presence of *Streptomyces* spp. in the grapevine carposphere. *Actinomycetes* 3:7-11.
- Vercesi A., Nasini G., Locci R.** (1992) Biological and chemical characterization of the antibioticactivity of *Streptomyces* species isolated from grapevine carposphere. *Actinomycetes* 3:1
- Vessey J.K.** (2003) Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571-586.
- Vidal J.R., Kikkert J.R., Malnoy M.A., Wallace P.G., Barnard J. and Reisch B.I.** (2006) Evaluation of transgenic ‘Chardonnay’ (*Vitis vinifera*) containing magainin genes for resistance to crown gall and powdery mildew. *Transgenic Research* 15: 69-82.
- Vigers A.J., Wiedemann S., Roberts W.K., Legrand M. Selitrenikoff C.P. and Fritig B.** (1992) Thaumatin-like pathogenesis-related protein are antifungal. *Plant Science* 83: 155-161.
- Viret O., Keller M., Jaudzems V.G. and Cole F.M.** (2004) *Botrytis cinerea* infection of grape flowers: light and electron microscopical studies of infection sites. *Phytopathology* 94: 850-857.
- Viterbo A., Ramot O., Chernin L., Chet I.** (2002) Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Anton. van Leeuw.* 81, 549–556.

- Vivas A., Barea J.M., Biro B., Azcon R.** (2006) Effectiveness of autochthonous bacterium and mycorrhizal fungus on Trifolium growth, symbiotic development and soil enzymatic activities in Zn contaminated soil. *J. Appl. Microbiol.* 100, 587-598.
- Wacksman S.A., Woodruff H.B.** (1940) The soil as a source of microorganisms antagonistics to disease producing bacteria. In “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”. Williams & Wilkins Eds. Vol. 4, pp: 2333-2648.
- Waksman S.A., Henrici A.T.** (1943) The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J. Bacteriol.* 46, 337-341.
- Waksman S.A.** (1950) The actinomycetes : their nature, occurrence, activities and importance. Chronica Botanica Company Ed. Waltham, Mass, p. 221.
- Wang K., Conn K. and Lazarovits G.** (2006) Involvement of quinolinate phosphoribosyl transferase in promotion of potato growth by a *Burkholderia* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 760-768.
- Wani P.A., Khan M.S., Zaidi A.** (2007) Chromium reduction, plant growth-promoting potentials and metal solubilization by *Bacillus* sp. isolated from alluvial soil. *Curr. Microbiology*. 54: 237-243.
- Wani S.P., Lee K.K.** (1992) Role of biofertilisers in upland crop production. In H.L.S. Tandon, ed. Fertilisers, organic manures, recyclable wastes and biofertilisers, pp. 91-112. New Delhi, Fertiliser Development and Consultation Organization.
- Watanabe N. and Lam E.** (2006) The hypersensitive response in plant disease resistance. In: Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants (Tuzun S. and Bent E., eds), Springer Science+Business Media, New York, United States of America, pp. 83-111.
- Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grinmont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M.I., Moore L.H., Moore W.E.C., Murray R.G.E., Stachebarandt E., Starr M.P. et Trüper H.G.** (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 463-464.
- Welbaum G., Sturz A.V., Dong Z. and Nowak J.** (2004) Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. *Critical Review in Plant Science* 23: 175-193.
- Weller D.M., van Pelt J.A., Mavrodi D.V., Pieterse C.M.J., Bakker P.A.H.M. and van Loon L.C.** (2004) Induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)-producing *Pseudomonas fluorescens*. In: Annual Meeting of The American Phytopathological Society, <http://www.apsnet.org/meetings/2004/abstracts/a04ma0738.htm>.

- Wendehenne D., Durner J. and Klessig D.** (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 449-455.
- Whipps J.M.** (1997) Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Advances in Botanical Research* 26: 1-133.
- Whipps J.M.** (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487-511.
- Whiteman S.A. and Stewart A.** (1998) Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation on irradiated grape leaf tissue by the antagonistic bacterium *Serratia liquefaciens*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 26: 325–330.
- Williams S.T., Lanning S., Wellington E.M.H.** (1984) Ecology of actinomycetes. In ‘The Biology of Actinomycetes’ Goodfellow M., Modarski M. & Williams S. T. Ed., Academic Press, London, pp : 481-528.
- Wijaya R., Neumann G.M., Condon R., Hugues A.B. and Polya G.M.** (2000) Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin. *Plant Science* 6: 243-255.
- Wittstock U. and Gershenson J.** (2002) Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 300-307.
- Wojciech J. J. and Lise K.** (2002) Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopatol.* 40:411-441.
- Wolf T.K., Baudoin A.B.A.M. and Martinez-Ochoa N.** (1997) Effect of floral debris removal from fruit clusters on botrytis bunch rot of Chardonnay grapes. *Vitis* 36: 27-33.
- Xiao K., Samac D.A., Kinkel L.L.** (2002) Biological control of Phytophthora root rots on alfalfa and soybean with Streptomyces. *Biol Control* 23, 285-295.
- Xing T., Malik K., Martin T. and Miki B.L.** (2001) Activation of tomato PR and woundrelated genes by a mutagenized tomato MAP kinase through divergent pathways. *Plant Mol. Biol.* 16(1):109-120.
- Yamamoto T., Iketani H., Ieki H., Nishizawa Y., Notsuka K., Hibi T., Hayashi T. and Matsuta N.** (2000) Transgenic grapevines plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Reports* 19: 639-646.
- Yamanaka K., Oikawa H., Ogawa H.O., Hosono K., Shinmachi F., Takano H., Sakuda S., Beppu T., Ueda K.** (2005) Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. *Microbiology* 151, 2899-2905.

Yao M.K., Tweddell R.J., Désilets H. (2002) Effect of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of micropropagated potato plantlets and on the extent of disease caused by *Rhizoctonia solani*. Mycorrhiza 12, 235-242.

Yuan W.M., Crawford D.L. (1995) Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC1 08 as potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. Appl. Environ. Microbiol. 61, 3119-3125.

Zaninotto F., La Camera S., Polverari A. and Delledonne M. (2006) Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. Plant Physiology 14: 379–383.

Zeidler D., Zähringer U., Gerber I., Dubery I., Hartung T., Bors W., Hutzler P. and Durner J. (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101: 15811-15816

Zimmerman W. (1990) Degradation of lignin by bacteria. J. Biotechnol. 13, 129-130.

RESULTATS

EXPERIMENTAUX

CHAPITRE I

Criblage et caractérisation d'Actinomycètes antagonistes de champignons phytopathogènes à partir d'habitats Marocains

Publication1 :

Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold

Auteurs : Souad Loqman, Essaid Ait Barka, Christophe Clément, Yedir Ouhdouch.

Journal: *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (2009), 28: 81-91.

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses à Gram-positif. Elles constituent l'un des groupes bactériens les plus versatiles et les plus importants de point de vue écologique et biotechnologique. En effet, ces microorganismes ont une grande capacité à produire de nombreux métabolites secondaires ayant des structures chimiques et des activités biologiques très diverses tels que des antibiotiques, des antifongiques, des enzymes, des stimulateurs et/ou des inhibiteurs de la croissance etc... De fait de ces aptitudes, les actinomycètes peuvent représenter un moyen de lutte efficace, persistant et sans effets négatifs vis à vis de l'environnement en comparaison avec les traitements chimiques et remplacer ainsi l'utilisation des antifongiques systémiques.

Le travail présenté dans ce premier article consiste en la recherche d'actinomycètes capables de produire des antifongiques efficaces contre *Botrytis cinerea*, agent causal de la pourriture grise de la vigne (*Vitis vinifera L.*). L'isolement des actinomycètes a été réalisé à partir de quatre sols rhizosphériques de la vigne saine sauvage du Maroc (Errachidia, Sahara, Skoura, Tinjdad).

Le criblage de cents quarante deux souches a été effectué sur un milieu sélectif des actinomycètes (extrait du sol rhizosphérique additionné d'un antifongique : l'actidione et d'un antibiotique antibactérien (anti-Gram négatif) : l'acide nalidixique). Nos résultats montrent que les isolats actinomycétales sélectionnés à partir du sol rhizosphérique de la vigne saine du Maroc présentent un pourcentage important (17%) d'isolats actifs vis-à-vis de moins 4 champignons tests mais seulement 9 isolats sélectionnés actifs sur les cinq champignons tests.

L'ensemble de ces 9 isolats peut constituer de ce fait un stock de microorganismes antagonistes de *Botrytis cinerea* dans le cadre de la lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne. Les résultats des investigations sur feuilles isolées ou sur les vitroplants de vigne ont montré que ce pathogène ne se développe pas en présence des actinomycètes sélectionnés et/ou leurs produits actifs.

Dans ce chapitre, nous détaillerons aussi les techniques utilisées pour le screening des actinomycètes à partir d'échantillons de sols rhizosphériques de la vigne saine sauvage du Maroc ainsi que la mise en évidence de leur activité *in vitro* vis-à-vis de *Botrytis cinerea* et l'aptitude de ces isolats à protéger la vigne *in vitro*.

Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold

Souad Loqman · Essaid Ait Barka · Christophe Clément · Yedir Ouhdouch

Received: 25 May 2008 / Accepted: 20 September 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract One hundred and forty-two different actinomycete strains were isolated from rhizosphere soil of *Vitis vinifera* L. sampled from four Moroccan areas. To evaluate the antifungal effect of the different collected actinomycete isolates, five fungi known to be phytopathogens (*Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, *Sclerotium rolfsii*, *Verticillium dahliae* and *Botrytis cinerea*) were used. Results showed that 24 isolates had an in vitro inhibitory effect toward at least 4 of the indicator fungi, but only 9 inhibited all these phytopathogens. These nine isolates were subsequently evaluated individually using in vitro grapevine plantlets for their ability to protect against plant gray mold. We demonstrate here that pre-inoculation of plantlets with these isolates allow them to withstand *Botrytis cinerea*. Six of these strains were shown to belong to the genus *Streptomyces* and three to the genus *Micromonospora*. These findings indicate the potential of developing effective actinomycetes from Moroccan habitats for the biological control of *Botrytis cinerea*.

Keywords Actinomycetes · Antifungal activity · *Botrytis cinerea* · Screening · *Vitis vinifera* L.

Introduction

The search for alternatives to chemical control of plant pathogens, such as biological control, has gained momentum in the recent years due to the emergence of fungicide-resistant pathogens and health concerns for the producer and the consumer (Compan et al. 2005). The control of pathogens by biological agents is not widely practised on a commercial scale, but there have been a number of experimental approaches which show potential for further development. In targeting fungal diseases, endophytic bacteria have shown significant control for different types of pathogens.

Among bacteria, the actinomycetes are important producers of bioactive compounds (Lange et al. 1993) and constitute a potential as biocontrol agents (Kim et al. 2000; Gomes et al. 2000; Ouhdouch et al. 2001). Actinomycetes represent a high proportion of soil microbial biomass, and appear to be of importance among the microbial flora of the rhizosphere (Sardi et al. 1992). Associations between actinomycetes and plant organs can be deleterious or beneficial for the host. While some actinomycetes secrete herbicidal compounds (Tanaka and Omura 1993) or cause plant diseases (Locci 1994), others can symbiotically fix atmospheric nitrogen (Oakley et al. 2004) or protect plants against fungal infections (Cao et al. 2005). Several descriptive researchers have shown that actinomycetes are a promising group of fungus-antagonistic and root-colonizing microbes. They protect to various degrees several different plants from soil-borne fungal pathogens (Xiao et al. 2002; Cao et al. 2005; El-Tarabily and Sivasithamparam 2006).

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11274-008-9864-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Loqman · E. A. Barka · C. Clément
Laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes,
Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne, UFR
Sciences—UPRES EA 2069, Université de Reims Champagne
Ardennes, 51687 Reims Cedex 2, France

S. Loqman · Y. Ouhdouch (✉)
Faculté de Sciences Semlalia, Département de Biologie,
Laboratoire de Biologie et de Biotechnologie des
Microorganismes, Université Cadi Ayyad (UCAM), Avenue
Prince My. Abdellah, BP 23 90, Marrakech 40 000, Morocco
e-mail: ouhdouch@ucam.ac.ma

The antagonistic impact of actinomycete species on pathogenic fungi is well known and a few species have been used as biological control agents (Yuan and Crawford 1995; Jones and Samac 1996; El-Tarabily et al. 1997; Bresnan 2003). Also, actinomycetes produce 70 to 80% of bioactive secondary metabolites, where approximately 60% of antibiotics developed for agricultural use are isolated from *Streptomyces* spp. (Ilic et al. 2007). As antibiotic producers or hyperparasites of fungi, actinomycetes have played an important role in controlling soil-borne plant pathogens (El-Tarabily et al. 2000). Consequently, biologists are becoming interested in using actinomycetes as agents to influence plant growth and for biological control of soil-borne root diseases of crop plants.

The Moroccan actinomycete microflora has been poorly explored to search new means of biocontrol suggesting that a careful exploration of new habitats might be useful (Barakat et al. 2002; Hamdali et al. 2008a). Since they are known as effective antagonists against several phytopathogens and are also promising source of metabolites with antibiotic activity, we aimed in this study to screen for new antagonistic actinomycetes isolates exhibiting a highly inhibitory effect against several pathogens fungi in general and *B. cinerea* particularly.

Materials and methods

Sampling

Samples were collected using Pochon and Tardieu method (1962) from four Moroccan Rhizosphere soils of healthy vineyard fields (Tinjadad, Skoura, Sahara, and Errachidia).

The samples from each of the rhizosphere soils were taken with an auger (up to 10 cm depth) after removing approximately 3 cm of the soil surface. Samples were placed in sterile polyethylene bags, closed tightly and stored in the refrigerator at 4°C until use.

Isolation of actinomycetes

Samples of each soil were first mixed, suspended in sterile distilled water (1 g in 100 ml) homogenized by vortexing and finally treated 10 to 15 min by sonication according to Ouhdouch et al. (2001). All treated samples were serially diluted up to 10^{-6} and spread (0.1 ml) over the surface of nutrient agar (Difco, USA), soil extract agar (Barakat et al. 2002) and Actinomycetes Isolation Agar (Olson's medium) (Olson 1968) (5% glycerol, 0.2% sodium caseinate, 0.01% L-asparagine, 0.4% sodium propionate, 0.05% K₂HPO₄, 0.0001% FeSO₄ and 1.5% agar Difco). The two media were supplemented with 40 µg/ml actidione to

inhibit the development of fungi (Olson 1968), and 10 µg/ml nalidixic acid to inhibit the bacteria capable of swarming without affecting the growth of actinomycetes (Nonomura and Hayakawa 1988; Balina et al. 1997). The plates were incubated at 28°C and the number of colonies was determined for total bacteria after 7 and 21 days for actinomycetes. Actinomycetes were recognized on the basis of morphological features following directions given by International *Streptomyces* Project (ISP) (Shirling and Gottlieb 1966). All observed colonies were isolated, purified and conserved in 20% glycerol at -20°C.

Antifungal assays

The antifungal activity of the isolates was determined by the plate diffusion method (Barakat et al. 2002) against *Botrytis cinerea* B.cinerea, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis*(Foa), *Sclerotinia rolfsii*(SR), *Verticillium dahliae*(VD) and *Pythium ultimum*(PU) (strain collection of the Phytopathology Laboratory, Marrakech). Isolates were grown on Bennett medium (beef extract [Merck, Germany] 1 g/l; glucose [Merck, Germany] 10 g/l; peptone [Merck, Germany] 2 g/l; yeast extract [Merck, Germany] 1 g/l and agar [Difco, USA] 15 g/l) for 14 days and 6-mm diameter agar disks containing actinomycete colonial mass were prepared by using sterile cork borers. Disks were then aseptically transferred to PDA plates having fungal mycelial-disk (diameter of 6 mm) in the centre. Plates were first kept in a refrigerator (4°C) for at least 4 h to allow the diffusion of any antibiotics produced, then incubated at 20°C. Inhibition zones were determined after 4 days of incubation. Only the isolates that showed an inhibition zone greater than 8 mm were considered as active isolates.

In order to test the effect of actinomycete on *B. cinerea* structure, a thin layer of PDA was aseptically removed from the zone of contact between *B. cinerea* and the isolate and placed in a drop of sterile water on a glass microscope slide. A cover slip was placed on the film, and observations were made under the microscope (Model BH2, Olympus, Japan).

Actinomycetes isolates showing the highest antagonist activity have been selected to further study their biological effect against gray mold of grapevines.

Inoculation plant assays

Plantlets of *Vitis vinifera* L. cv. 'Chardonnay' clone 7535 were micropropagated by nodal explants grown on 15 ml semi-solid medium (Martin et al. 1987), in 25-mm culture tubes under 200 µmol/m² white fluorescent light, 16 h photoperiod at 26°C (Ait Barka et al. 2000). Uniform plantlets ($n = 24$) were selected for each treatment in each experiment. Fungal pathogen or actinomycetes isolates

were applied to detached leaves maintained in Petri dishes or to the whole grapevine plantlet (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay). Using a spectrophotometer (600 nm), the actinomycete concentration was adjusted to 10^6 c.f.u./ml with PBS as described by Ait Barka et al. (2000). The concentration was confirmed by plate counting. Leaves were inoculated by depositing 20 µl of *B. cinerea* (10^5 spores/ml suspended in sterile distilled water) on their surface. Two days after treatment, 30 µl of the actinomycete suspension (10^6 c.f.u./ml) was deposited on the top of each leaf. Control plants were treated similarly but only with sterile distilled water. Gray mold symptoms were evaluated 5 days after inoculation with *B. cinerea* and samples were processed for light microscope investigations.

Microscopy analysis

Fresh plant leaves inoculated with actinomycete isolates, *B. cinerea*, both actinomycete isolates and *B. cinerea* or control (water) were collected and prepared for microscopy analysis according to Gognies et al. (2001). Briefly, plant organs were fixed for 24 h at room temperature in 2% (w/v) glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.24) with 2% (w/v) sucrose and 0.1% (v/v) Tween 20. After 3 rinses (5 min each) with the phosphate buffer and 2% (w/v) sucrose, samples were fixed for 4 h in 1% (w/v) osmium tetroxide in the phosphate buffer with 2% (w/v) sucrose. The samples were then dehydrated in an alcohol series, transferred to acetone and embedded in Araldite. Semi-thin sections (1 µm) of different treatments were collected on glass slides and stained with 0.1% toluidine blue and examined under microscope (model BH2; Olympus, Japan).

Morphological, physiological and chemotaxonomic characterization of selected bacterial isolates

The morphological, cultural, physiological and biochemical characteristics of the selected isolates were evaluated as described in the International Streptomyces Project (ISP) (Shirling and Gottlieb 1966). Cultural characteristics were observed on yeast extract-malt extract agar (ISP2), oatmeal agar (ISP3) and inorganic salts-starch agar (ISP4) media at 30°C for 7–21 days and the color series were determined according to the system proposed by Nonomura (1974). The assimilation of carbohydrates was studied by using the medium ISP9, containing 16 different carbohydrates at a concentration of 1% (w/v) as sole carbon source. The chemical analyses of the diaminopimelic acid isomer were performed as described by Becker et al. (1964). Spore chains morphology and spore shapes were observed on the same media using light microscopy.

Amplification and sequencing of the 16S rDNA of the selected strains

The purified selected actinomycete isolates were grown for 2 days at 28°C with agitation in 500-ml flasks containing 100 ml of Hickey-Tessner medium containing 1 g l⁻¹ yeast extract, 1 g l⁻¹ beef extract, 2 g l⁻¹ NZamine A, 10 g l⁻¹ Dextrin, 20 mg l⁻¹ CoCl₂ · 6H₂O (Hopwood et al. 1985). Biomass was harvested by centrifugation (8,000 g for 10 min) and washed twice with double-distilled water. 200 mg of mycelium was used for DNA extraction as described in Liu et al. (2000). The 16S rDNA was amplified using the PCR method with *Taq* DNA polymerase (Qiagen, USA) and universal primers PA (5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3') and PH (5'-AAGGAGGTGATCCA GCCGCA-3'). Amplification was carried out in 50 µl reaction mixture containing 1.5U of AmpliTaq Gold *Taq* polymerase (Applied Biosystems), 10 µl of 5× AmpliTaq Gold reaction buffer (Applied Biosystems), 2.5 mM of each dNTP, 1 µM of each primer and 100 ng of genomic DNA. Reaction conditions were: 97°C for 4 min, (97°C for 45 s, 52°C for 45 s and 72°C for 45 s) × 35 cycles followed by an incubation at 72°C for 10 min. The amplified products were visualized on a 0.8% (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide. Sequencing reactions were performed by Macrogen (Seoul, Korea). The obtained sequences were compared for similarity with sequences present in the genomic database banks, using the 'NCBI Blast' program available at the ncbi.nlm.nih.gov web site.

Statistical analyses

Unless stated otherwise, replicates of 24 plants were used per treatment. Collected data were analysed statistically using ANOVA. Means for each treatment were separated with a least significant difference (LSD, $P < 0.05$) multiple comparison test (Fisher's protected). All experiments were repeated at least three times.

Results

Distribution of actinomycetes

The pH of sampled soils ranged from 6.8 to 8.1 while percentage of moisture varied from 5 to 32% according to the different sites. Determination of the total bacteria shows that their number ranged from 10 to 53×10^8 c.f.u./g of dry soil. The rate of actinomycetes varied from 16 to 65×10^6 c.f.u./g dry soil according to studied habitats. One hundred forty two actinomycete isolates with different morphological characteristics were selected from the four rhizosphere soil samples.

Antifungal activity

Actinomycete strains exhibiting the ability to produce both clear zones on mycelium agar and metabolites against the tested organisms were considered antagonistic. A relatively high proportion (17%) of the 142 actinomycetes initially sampled from the rhizosphere soil were antagonistic toward at least 4 indicator microorganisms, but only 9 isolates (6.3%) showed an *in vitro* effect toward all the microorganisms used. Among these, two (SSh10 and SSh18) isolates originated from Sahara and seven from Skoura (SS5, SS6, SS22, SS27, SS38, SS39 and SS40).

Interactive reaction between actinomycetes and *B. cinerea*

There was a significant interaction between the actinomycete isolates and the phytopathogenic fungus. When the fungus was grown with actinomycete isolates on the same PDA plate, a significant zone of inhibition was observed around the fungus inoculum (Fig. 1). However, the level of inhibition varied according to isolates, with SS38, SS40 and SS22 as the powerful isolates with the higher degree of inhibition.

Actinomycete isolates were effective in restricting radial growth of *B. cinerea*. Microscopic observations showed a marked morphological changes and severe structural alterations of the fungal mycelium (Fig. 2b-d). Furthermore, we observed coagulation into the fungus cytoplasm characterized by the appearance of small vesicles or in extreme cases larger vesicles or even empty cells devoid of cytoplasm (Fig. 2b-d).

Fig. 1 Interaction between selected actinomycetes and *B. cinerea* when inoculated together on PDA (distance confirmation). (a: ST16; b: SS27; c: SSh18; d: SS39; e: SS40; f: SS6; g: SS38; h: SS5; i: SSh10; j: SS22). The fungus is in the centre of the Petri dish



Interaction between plant and *B. cinerea*

The nine selected isolates presented the same potential and pattern to suppress the attack of plantlets by *B. cinerea*. To avoid redundancy, only results obtained with SS38 isolates will be presented here. The control leaves were healthy (Fig. 3a), whereas leaves treated with *B. cinerea* exhibited the classic symptoms of gray mold (Fig. 3c). However, symptom development on detached leaves did not occur when plantlets were inoculated with actinomycetes (Fig. 3b). When *in vitro* detached leaves (from control plantlets and plantlets inoculated with actinomycetes isolates) were challenged with *B. cinerea*, the fungal growth was suppressed on leaves subsequently treated with the isolates (Fig. 3d), indicating that the presence of the actinomycetes restrict the spread of the pathogen. The same protection toward *B. cinerea* was observed when whole plantlets were subsequently inoculated with actinomycetes (Fig. 4).

Microscopic analysis

Control leaves show unaltered tissues (Fig. 5a). Treatment of leaves with isolates had no incidence on leaf structure (Fig. 5b), while the parenchyma of pathogen-inoculated leaves showed an intensive colonization by *B. cinerea* (Fig. 5c). Pathogen ingress toward the inner tissues coincided with extensive plant cell disorganization such as host cell wall alteration (Fig. 5c). In massively invaded areas, cell walls were no longer discernible in extreme cases (Fig. 5c). Nevertheless, leaves pre-treated with actinomycete isolates before their inoculation with *B. cinerea*

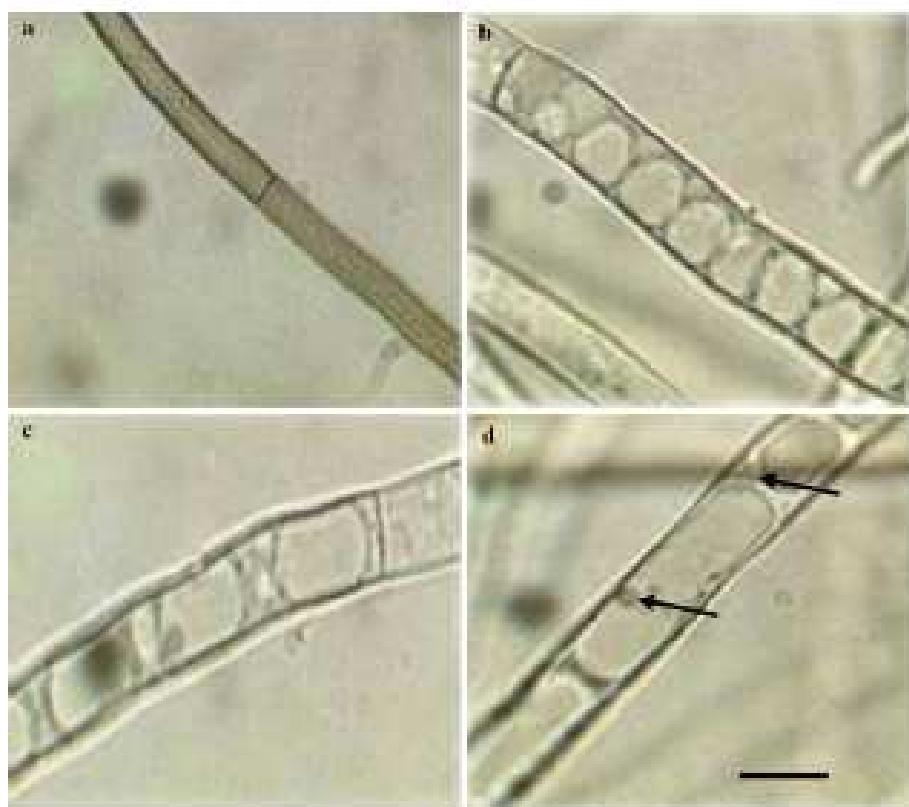


Fig. 2 Hyphal mycelium from the zone of interaction between *R. cinnabarinus* and actinomycetes isolates. **a** Normal hypha of *R. cinnabarinus*. **b-d** Mycelium taken in the zone of interaction between *R. cinnabarinus* and isolate SS38. **b** Partially engorged mycelium. **c** Big vesicles in the mycelium. **d** Haustorial mycelium (arrow). Bar = 40 μ m (a), 100 μ m (b-d)

and isolate SS38. **b** Partially engorged mycelium. **c** Big vesicles in the mycelium. **d** Haustorial mycelium (arrow). Bar = 40 μ m (a), 100 μ m (b-d)

showed that pathogen growth was stopped at the leaf surface (Fig. 5d).

Taxonomical characterization of the selected isolates

The nine selected strains were tested for taxonomic diversity using morphological, cultural, physiological and biochemical criteria as well as others features (Table 1). Morphology of the actinomycetes colonies was determined on the media used for their isolation. The aerial and substrate mycelium color was determined on media ISP2, 3, 4 and 6 (Table 1). The nine strains showed different abilities to assimilate 17 carbon sources tested. All strains were able to use citrate, sucrose, fructose, glucose, maltose, mannitol, mannose, melibiose, lactose and glycerol as sole carbon sources whereas inositol, D-raffinose, sorbitol, rhamnose, galactose, and tylose were not used by SS18, SS5, SS22 and SS38 but only these strains were able to use arabinose (Table 1). All strains were sensitive to Novobiocin (30 μ g) and Polymyxin B (300 U) (Table 1). Strains SS10, SS18, SS5, SS6, SS22, and SS38 were resistant to sulfamides but

SS27, SS39 and SS40 were sensitive. Strains SS5, SS6 and SS27 were resistant to Gentamycin (10 μ g) and Bacitracin (10 U) whereas SS10, SS18, SS22, SS38, SS39 and SS40 were sensitive to these antibiotics. Only strains SS27 and SS38 were resistant to Cefaktein (30 μ g).

The analysis of cellular constituents of the nine isolates revealed the presence of the L-diaminopimelic acid (DAP) isomer except three isolates SS5, SS39 and SS40 has DL-DAP (Table 1). Six of the selected isolates were assigned to the genus of *Streptomyces* and three to the genus of *Micromonospora*.

The sequencing of the 16S RNA of these strains (Table 2) confirmed this classification. SS10 and SS38 isolates exhibited 98% and 99% sequence identity to *Streptomyces amarae*, respectively. SS18, SS6, SS22 and SS27 isolates exhibited 98% sequence identity to *Streptomyces endosymbiotum* of *Phyllosticta tenuestrus*, *Streptomyces fuscoviridis*, *Streptomyces* sp. FXJ23 and *Candidatus Streptomyces philaethri biovar basilaris* respectively. SS5, SS39 and SS40 exhibited 98% sequence identity to *Micromonospora flavogrisea*.

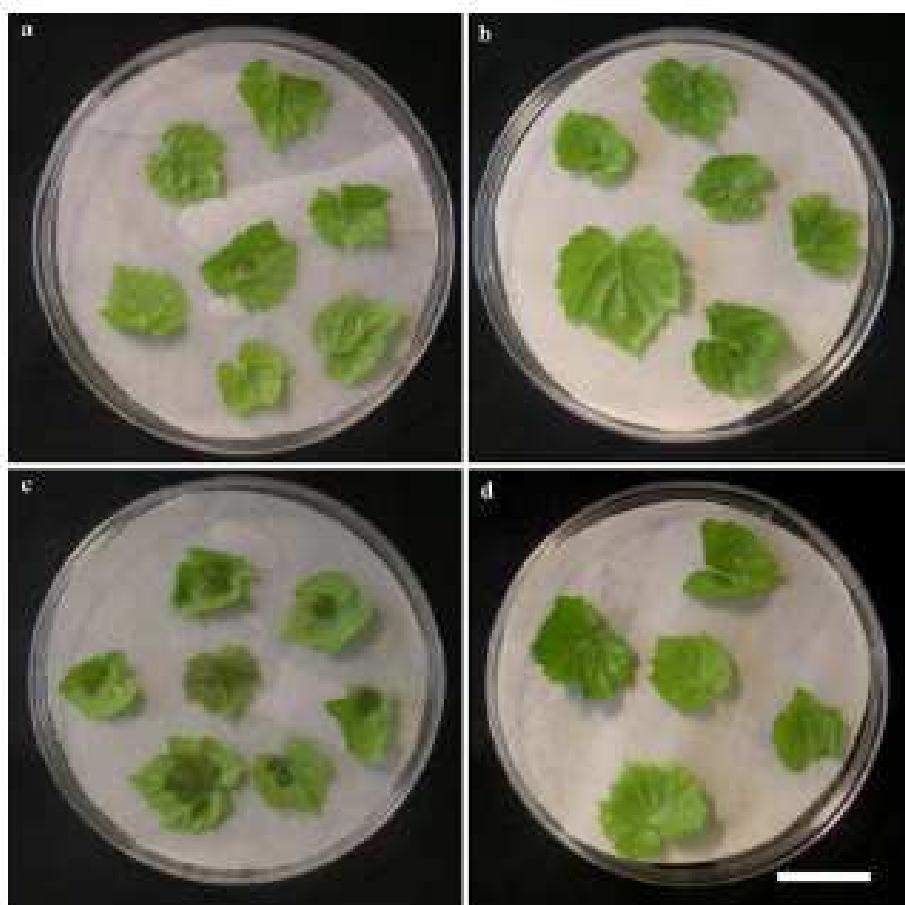


Fig. 3 Incubation experiments on detached leaves of *V. vinifera* with *B. cinerea*. **a** Leaves from control plants; **b** leaves inoculated with actinomycete (isolate SSM); **c** leaves inoculated with *B. cinerea* and

exhibiting the symptoms of gray mold disease; **d** leaves pre-treated with isolate SSM before their incubation with *B. cinerea* showing enhanced resistance toward the pathogen. Bar = 2 cm

Discussion

In this study, actinomycetes from four Moroccan Rhizosphere soils of healthy vineyard fields were investigated. Actinomycete counts were lower in alkaline soils than in neutral soils supporting the fact that, in general, actinomycetes prefer neutral to alkaline soils as a natural habitat as reported by Goodfellow and Williams (1983). According to data available in the literature, the species composition of actinomycetes in the plant rhizosphere is mainly determined by soil parameters, whereas the abundances of particular species depend largely on the plant (Kalakatskii and Shemya 1990). The observed distribution of actinomycetes in the rhizosphere soils investigated are in line with results from previous studies of indigenous Moroccan habitats. Barakat et al. (2002) and Hamdali et al. (2008a) showed a similar proportion of actinomycetes in the bacterial population. During previous investigations on Italy grapevine

microflora, the constant presence of *Sreptomyces* was ascertained (Vercesi et al. 1990, 1991, 1992).

The plant possesses its own mechanisms of resistance (Franceschi et al. 2005), but the micro-organisms of the soil could contribute to this fight by excreting substances limiting the growth of phytopathogenic fungi (Vassilev et al. 2006; Jain and Jain 2007) or stimulating the natural defences of the plant (Prévost et al. 2006; Lehr et al. 2008). In the present study, the nine selected Actinomycete isolates, belonging to *Sreptomyces* and *Micromonospora* genera, were shown to be efficiency able to limit growth, at least on Petri dishes, of *B. cinerea*, the gray mold agent. The confirmation of this protective effect in soil is now in process. As reported by other studies, this protective effect might be increased by the ability of the selected Actinomycete strains to excrete chitinases (Taechowisan et al. 2004), IAA (Martinez-Noel et al. 2001), siderophores (Mattioli et al. 2007; Hamdali et al. 2008a; Cao et al. 2005)



Fig. 4 Grapevine plants: **a** Control plants; **b** control plants + *B. cinerea* showing the visual symptoms of gray mould; **c** plants inoculated with isolate 5538; **d** plants pre-treated with actinomycete isolate before their inoculation with *B. cinerea* showing enhanced resistance toward the pathogen. Bar = 1 cm

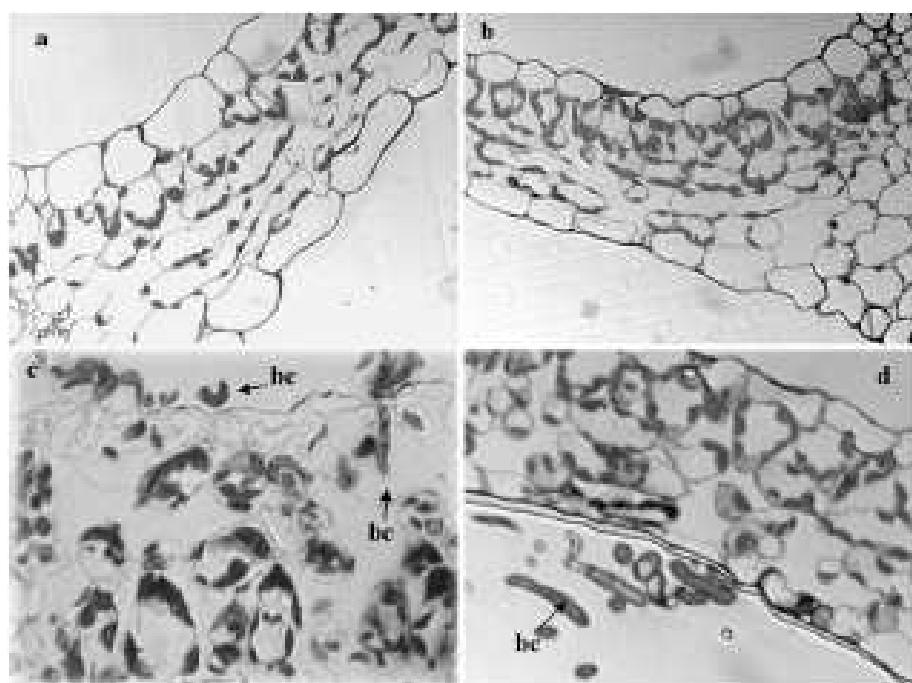


Fig. 5 Light micrographs of samples from grapevine leaves. **a** Sample from the untreated (control) grapevine leaves. **b** Leaves inoculated with actinomycetes (isolate 5538); **c** leaves inoculated with *B. cinerea* and exhibiting the symptoms of gray mould disease. The hyphae of the pathogen abundantly colonize the epidermis and the parenchyma. Fungal growth occurs both intracellularly and

intercellularly. Pathogen ingress inside the leaf coincides with local cell wall alterations (arrows). **d** Leaves pre-treated with isolate 5538 before their inoculation with (*B. cinerea* = bc) showing enhanced resistance toward the pathogen as fungal growth is mainly restricted to the epidermis

Table 1 Biochemical and morphological characteristics of the nine active isolates

Origin	Solanum		Solanum					
	SSM10	SSM18	SS5	SS6	SS22	SS27	SS38	SS39
Characteristics								
ISP3	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++
ISP4	+++	-	++	-	++	+++	+++	+++
ISP6	+	-	+	-	-	+	+	+
Aerial spore mass	Grey	Grey	-	Grey	White	Grey	White	White
Colony reverse	Grey	Grey	Cream	Grey	Cream	Grey	Cream	Yellow
Soluble pigment	-	-	Deep green	-	Deep yellow	-	-	Deep yellow
Spore morphology	RF	RF	Single conidia	RF	SS	SS	RF	Single con.
DAP-isozyme	II	II	II	II	II	II	II	II
Giemsa staining	+	+	+	+	+	+	+	+
Tyrosin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-
C. source utilization	+							
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+
Fruuctose	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	-	-	+	-	+	+	+
Inositol	+	-	-	+	-	+	+	+
Rhamnose	+	-	-	+	-	+	+	+
Xylose	+	-	-	+	-	+	+	+
D-Raffinose	+	-	-	+	-	+	+	+
Sorbitol	+	-	-	+	-	+	+	+
Arabinose	-	-	+	-	+	+	+	-
Antibiotic sensitivity								
Novobiocine (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S
Polymyxin B (300 U)	S	S	S	S	S	S	S	S
Cefotaxime (30 µg)	S	S	S	S	S	R	R	S
Gentamycin (10 µg)	S	S	R	R	S	R	S	S
Racemicine (10 U)	S	S	R	R	S	R	S	S
Sulphonides (250 µg)	R	R	R	R	R	S	R	S

+, tested positive/ utilized as substrate

-, tested negative/ not utilized as substrate

RF = rifecillin, SS spind., R resistant, S sensitive

or to other anti-fungal substances (Xiao et al. 2002; Errakhi et al. 2007).

The nine selected isolates were antagonistic towards *B. cinerea* on potato dextrose agar, suggesting that antibiotics

may be one of the mechanisms controlling th. Paul and Banerjee (1986) showed that solubil produced by *Streptomyces galbus* can inhibit nation of *Alternaria solani*, *Aspergillus niger*,

Table 2 Percentage of sequence identity to the sequence of 16S rRNA of other Actinomycetes strains

Selected isolate	Sequence identities (%)	Actinomycetes strains
SSh10	93	<i>Streptomyces avermitilis</i>
SSh18	93	<i>Streptomyces endosymbiotis</i> of <i>Philenothrix venusta</i>
SS5	93	<i>Micromonospora flavogrisea</i>
SS6	93	<i>Streptomyces fimicarius</i>
SS22	93	<i>Streptomyces</i> sp. FXJ23
SS27	93	<i>Candidatus Streptomyces philathi biosvar basalis</i>
SS38	99	<i>Streptomyces avermitilis</i>
The alignments were made with 1,400 to 1,500 bp long DNA segments	SS39	<i>Micromonospora flavogrisea</i>
	SS40	<i>Micromonospora flavogrisea</i>

pallidum, and *Helminthosporium oryzae*. More recently, mycelium growth of *C. cerasitidis* and *C. gloeosporioides* was also inhibited by the actinomycetes cultures, when grown jointly in PDA medium plates (Soares et al. 2006). Recently, examination under the light microscope showed litter decomposer fungal colony margins adjacent to the actinomycetes colonies showing the lysing of hyphae and shorted hyphae of germinating spores (Jayasinghe and Parkinson 2008). There are many reports related to antibiotic substances which induced malfunctions such as stunting, distortion, swelling, hyphal protuberances or highly branched appearance of fungal germ tubes (Canji et al. 1983; Gefa and Vikineswary 2002). Our microscopic observations showed marked morphological changes and severe structural alterations of the fungal mycelium in the presence of actinomycetes. These results are in line with earlier observation of several sections of the invading hyphae, which displayed various levels of cellular disorganization that ranged from wall loosening to cytoplasm disintegration, as a result of treatment with a biological control agent (Masih et al. 2000; Ait Barka et al. 2000). Several studies reported that *B. cinerea* mycelium presents severe morphological changes characterized by excessive branching and swelling of the cell wall when the fungus was co-cultured with antagonists (Larkin and Favel 1998; Ait Barka et al. 2000).

Our study demonstrates that the nine selected isolates presented the same potential to suppress the attack of plantlets by *B. cinerea*, providing an evidence of the beneficial effect of actinomycetes isolates in reducing the extension of fungal colonization into the plant tissues. In similar way, it has been demonstrated that when grapevine plantlets were bacterized with Strain PsJN (Ait Barka et al. 2002) or *Pichia anomala* strain FY-102 (Masih et al. 2000), and then inoculated with *B. cinerea*, the symptoms of gray mold failed to develop, demonstrating that the presence of antagonists was accompanied by an induction of plant resistance to the pathogen. According to El-Tantawy and Sivasithamparam (2006), non-streptomyces actinomycetes are among the biocontrol agents studied, especially those belonging to the genus *Micromonospora*, which are known

for the production of antibiotics and bioactive compounds, which act in the control of plant pathogens. Recently, the capacity of *Micromonospora curvata* to control *Pythium ultimum* in vitro and in wheat plants grown in pots was reported by Hamdi et al. (2008b).

When plants inoculated only with actinomycete isolates were sampled several weeks later, and their tissues were macerated in buffer and cultured on PDA medium, the isolates were able to grow on the medium demonstrating that the actinomycetes establish sufficient endophytic populations in the plant (unpublished data). This characteristic may allow to them to produce significant amounts of antifungal compounds which may induce plant defence mechanisms.

Six of the most selected isolates were assigned to the genus of *Streptomyces* and three to the genus of *Micromonospora*. Although strains SS40, SS39 and SSS were classified as *Micromonospora flavogrisea* and strains SS38, SSh10 as *Streptomyces avermitilis*, the isolates showed different biochemical and morphological characteristics (Table 1) and (Fig. 1). The additional comparative studies are needed to resolve the finer taxonomic position of our selected strains, especially since the strains have identical or nearly identical 16S rRNA gene sequences. DNA-DNA relatedness studies are used routinely to resolve finer taxonomic relationships between closely related actinomycetes (Kim et al. 2008; Groth et al. 2004)

Conclusion

The present work describes the potential of nine actinomycetes to inhibit mycelia growth in vitro and in planta as shown by the healthy plantlets despite the presence of *B. cinerea*. However, the inhibitory effect of these isolates on the growth of soil-borne fungal pathogens and disease development is probably derived from more than one mechanism. Although the exact mechanisms by which these actinomycetes isolates operate to reduce disease incidence is not elucidated, one possibility is that these

biocontrol agents exert a direct inhibitory effect on hyphal growth and structure of fungal pathogens. Further studies are necessary to evaluate the effect of these potential biocontrol agents in greenhouse and field conditions, and also to purify and characterize the secondary metabolites produced by these actinomycetes.

References

- Ait Barka E, Belaïdi A, Hachet C, Nowak I, Audras JC (2000) Enhancement of in vitro growth and resistance to grey mould of *Vitis vinifera* L. co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. FEMS Microbiol Lett 186:91–95. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09474.x
- Ait Barka E, Gogues S, Nowak I, Audras JC, Belaïdi A (2002) Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. Biol Control 24:135–142. doi:10.1016/S1049-9644(02)00034-3
- Baekdou M, Ouhdaou Y, Ouhda K, Beaufeu C (2002) Characterization of rhizosphere soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. World J Microbiol Biotechnol 18:49–54. doi:10.1023/A:1013966407890
- Becker B, Lechevalier MP, Gordon RE, Lechevalier HH (1964) Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. Appl Microbiol 12:1241–1243
- Bressan W (2003) Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes. Biocontrol 48:233–240. doi:10.1023/A:1022679326324
- Bulina TI, Alfusova IV, Terchikova LP (1997) A novel approach to selection of actinomycetes involving irradiation of soil samples with microwaves. Mikrobiologiya 66:231–234
- Cho L, Qiu Z, You J, Tan H, Zhou S (2005) Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* with pathogens from surface-sterilized banana roots. FEMS Microbiol Lett 247:147–152. doi:10.1016/j.femsle.2005.05.006
- Champat S, Duffy B, Nowak I, Clément C, Ait Barka E (2005) Biocontrol of plant diseases using plant growth-promoting bacteria (PGPB): principles, mechanisms of action and future prospects. Appl Environ Microbiol 71:4951–4959. doi:10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005
- El-Tarably KA, Srivastavam K (2006) Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Soil Biol Biochem 38:1305–1320. doi:10.1016/j.soilbiol.2005.12.017
- El-Tarably KA, Hardy GE, Srivastavam K, Hassanein AM, Karunohar DI (1997) The potential for biological control of cavity-spot disease of carrots, caused by *Pythium ultimum* by Streptomycete and non-Streptomycete actinomycetes. New Phytol 137:493–507. doi:10.1046/j.1469-8137.1997.00356.x
- El-Tarably KA, Soliman MH, Nasar AH, Al-Hassani HA, Srivastavam K, McKenna P, Hardy GE, St J (2000) Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. Plant Pathol 49:573–583. doi:10.1046/j.1365-3059.2000.00494.x
- Erakhtia R, Boucada F, Lebahi A, Benkace M (2007) Evidence of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotinia cepivora* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). World J Microbiol Biotechnol 23:1503–1509. doi:10.1007/s11274-007-0994-7
- François VR, Kokorec P, Christiansen R, Kückling T (2005) Anatomical and chemical defences of coffee bark against bark beetles and other pests. New Phytol 167:353–375. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01436.x
- Geha K, Vithanaway S (2002) Antagonistic effects of *Streptomyces violaceorubescens* G10 on *Paracanthareus opopaeum* f. sp. *calcarata* race 4: indirect evidence for the role of antibiotics in the antagonistic process. J Ind Microbiol 28:303–310. doi:10.1007/s00347-002-00024-7
- Gogues S, Belaïdi A, Ait Barka E (2001) *Sacharomyces cerevisiae*, a potential pathogen towards grapevine, *Vitis vinifera*. FEMS Microbiol Ecol 37:143–150. doi:10.1111/j.1574-6941.2001.tb00862.x
- Gomes RC, Semedo LT, Souza EM, Alvimio CR, Linhares LF, Coelho RR (2006) Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. Lett Appl Microbiol 43:146–150. doi:10.1046/j.1472-785x.2006.06837.x
- Goodfellow M, Williams ST (1983) Ecology of actinomycetes. Annu Rev Microbiol 37:189–216. doi:10.1146/annurev.mi.37.100183001201
- Gupta S, Arora K, Reghu T (1993) Screening and fungal activities according including morphological abnormalities. Agric Biol Chem 47:2061–2069
- Groth I, Rodriguez C, Schmitz B, Schmitz P, Lesser E, Goodfellow M (2004) Five novel *Kluyveromyces* species from soil: *Kluyveromyces adorabilis* sp. nov., *K. garroneensis* sp. nov., *K. nipponeensis* sp. nov., *K. parvulus* sp. nov. and *K. terrenus* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 54:2121–2129. doi:10.1099/ijs.0.03070-0
- Hendrik H, Boutagane R, Haddi M, Lebahi A, Virelle MV, Ouhdaou Y (2008a) Screening for rock phosphate solubilizing actinomycetes from Moroccan phosphate mines. Appl Soil Biol 33:12–19. doi:10.1016/j.apsoil.2007.08.007
- Hendrik H, Haddi M, Virelle MV, Ouhdaou Y (2008b) Rock phosphate solubilizing Actinomycetes – screening for plant growth-promoting activities. World J Microbiol Biotechnol. doi:10.1007/s11274-008-9817-0
- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Burson CJ, Kieser HM, Lyndley DJ, Smith CP, Ward JM, Scheraga H (1995) Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. John Wiley Foundation, Norwich, United Kingdom
- Ho SR, Konstantinovic SS, Todorovic ZB, Lazar ML, Veljkovic VR, Jokovic N, Radovanovic BC (2007) Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in Streptomyces isolates. Microbiology 153:421–428. doi:10.1099/mic.0.26170-0
- Kim PK, Jain PC (2007) Isolation, characterization and antifungal activity of *Streptomyces komarovii* OS 1322. Indian J Exp Biol 45:203–206
- Krajmalnik DBAT, Parkinson D (2008) Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. Appl Soil Biol 38:109–113. doi:10.1016/j.apsoil.2007.09.005
- Kruse CR, Samac DA (1996) Biological control of damping-off of alfalfa seedling damping-off with a disease-suppressive strain of *Streptomyces*. Biol Control 7:196–204. doi:10.1006/bcon.1996.0084
- Kim BS, Moon SS, Hwang BK (2000) Structure elucidation and fungal activity of an antibiotic antibiotic, dianomycin, isolated from *Actinomadura novobioides*. J Agric Food Chem 48:1873–1881. doi:10.1021/jf9906402
- Kim SR, Lonsdale J, Seong CN, Goodfellow M (2003) *Streptosulfaphilic* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family *Streptomycetaceae*. Antonie Van Leeuwenhoek 83:107–116. doi:10.1023/A:1023997724023
- Kukuruzki LV, Shama L (1990) Actinomycetes and higher plants. Usp Mikrobiol 226–65

- Lange L, Beisholt J, Rasmussen FW, Nielsen RJ (1993) Microbial fungicides—the natural choice. *Plant Sci* 39:155–160. doi: 10.1007/BF02780390/209
- Larkin RP, Pavel R (1998) Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of Tomato. *Plant Dis* 82:1022–1023. doi: 10.1094/PDIS.1998.82.9.1022
- Lehr NA, Schrey SD, Hennig R, Tarkka MT (2008) Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. *New Phytol*. doi: 10.1111/j.1469-3537.2007.03222.x
- Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J (2000) Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *J Clin Microbiol* 38:1471–1471
- Locci R (1994) Actinomycetes as plant pathogens. *Eur J Plant Pathol* 100:179–200. doi: 10.1007/BF01876235
- Martin C, Venoy R, Camé M, Vesselle G, Collas A, Bougeac C (1987) The uses and techniques of *in vitro* cultivation. *Bull Org Int Vigne* 67:6447–458
- Mathi EL, Alz J, Paul B (2000) Can the grey mould disease of the grape-vine be controlled by yeast? *FEMS Microbiol Lett* 189:233–237. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09236.x
- Mathijssen S, Tehrani KA, Liao G, Jackson RW, Cooper RM, Comello P (2007) Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-*Pythium* activity. *Environ Microbiol* 9:425–434. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01154.x
- Martinez-Nestor GMA, Madrid EA, Bonomi R, Lazarina L (2001) Indole acetic acid attenuates disease severity in potato-*Phytophthora infestans* interaction and inhibits the pathogen's growth *in vitro*. *Plant Physiol Biochem* 39:815–823. doi: 10.1006/SPBI.9428/0101298-0
- Nakamura H (1974) Key for classification and identification of 485 species of the *Streptomyces* included in the ISP. *J Ferment Technol* 52:78–92
- Nakamura H, Hayakawa M (1988) New methods for selective isolation of soil actinomycetes. In: Okami Y, Beppu T, Ogawa H (eds) Biology of actinomycetes. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp 288–293 ISBN 4-7622-1552-X
- Oakley B, North M, Franklin JE, Hedlund BF, Staley JT (2004) Diversity and distribution of *Frankia* strains symbiotic with *Ceanothus* in California. *Appl Environ Microbiol* 70:6444–6452. doi: 10.1128/AEM.70.11.6444-6452.2004
- Olson EH (1968) Actinomycetes Isolation Agar. In: Difco supplementary literature. Difco Lab., Detroit, (Mich.)
- Ouhdouch Y, Barakat M, Finale C (2001) Actinomycetes from Moroccan habitats: screening for antifungal activities. *Eur J Soil Biol* 37:69–74. doi: 10.1016/S1164-5561(01)00699-X
- Paul AK, Basarjee AK (1996) *In vitro* effect of antifungal antibiotic produced by *Streptomyces galbus* 5 MB-14. *Hindustan Antibiot* 28:15–19
- Pochon J, Tredoux P (1962) Technique d'analyse en microbiologie du sol. Edition de la Toussouelle, Saint-Mandé
- Prévost K, Couture G, Slipley B, Bielecki R, Beaulieu C (2006) Effect of chitosan and a biocontrol streptomycete on field and potosuber bacterial communities. *Biocontrol* 51:533–546. doi: 10.1007/s10526-005-4340-x
- Sardi P, Samocchi M, Quarini S, Penoloni B, Borgognoni GE, Nedli S (1992) Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. *Appl Environ Microbiol* 58:2691–2698
- Shirling EB, Gottlieb D (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 16:313–340
- Sousa ACF, Sousa CS, Gerardo MS, Perez JO, Almeida NS (2006) Soil Streptomycetes with *in vitro* activity against the yam pathogen *Curvularia eragrostidis* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Bras J Microbiol* 37:456–461. doi: 10.1590/S1517-83822006000400010
- Tachiwana T, Pebernard JP, Liangying S (2004) PCR cloning and heterologous expression of chitinase gene of endophytic *Streptomyces interfaciens* CMUAc130. *J Gen Appl Microbiol* 50:177–182. doi: 10.2323/jgam.50.177
- Tanaka Y, Osumi S (1993) Agroactive compounds of microbial origin. *Annu Rev Microbiol* 47:57–87. doi: 10.1146/annurev.mi.47.100493.000421
- Vassiliev N, Vassilieva M, Nikolaeva I (2006) Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Appl Microbiol Biotechnol* 71:137–144. doi: 10.1007/s00253-006-0380-z
- Vercesi A, Volpi R, Locci R (1990) Preliminary investigations on the *Streptomyces* flora of grapevine berries. *Actinomycetes* 1:7–9
- Vercesi A, Volpi R, Locci R (1991) On the presence of *Streptomyces* spp. in the grapevine rhizosphere. *Actinomycetes* 3:7–11
- Vercesi A, Nakai G, Locci R (1992) Biological and chemical characterization of the antibiotic activity of *Streptomyces* species isolated from grapevine rhizosphere. *Actinomycetes* 3:1
- Xiao K, Kiskel LL, Samac DA (2002) Biological control of *Phytophthora* root rot on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. *Biol Control* 23:285–295. doi: 10.1006/bcon.2001.1015
- Yuan WM, Crawford DL (1995) Characterization of *Streptomyces hyacinthus* WYE108 as potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl Environ Microbiol* 61:3119–3128

CHAPITRE II

Actinomycètes promoteurs de la croissance des plantes (PGPR) en tant qu'agents de lutte biologique

Publication 2:

**Correlation between endophytic potential and anti-Botrytis activity of
Actinomycetes isolated from rhizospherical Moroccan grapevine**

Auteurs : Souad Loqman, Essaid Ait Barka, Christophe Clément, Yedir Ouhdouch.

Journal : soumis à *Biological control* (en révision).

Publication 3:

**Growth promoting effect on *Vitis vinifera* L. of antagonistic actinomycetes
isolated from rhizospherical Moroccan grapevine.**

Auteurs : Souad Loqman, Essaid Ait Barka, Christophe Clément, Yedir Ouhdouch.

Journal : soumis à *Biological control*.

Dans le sol, l'activité microbienne est intense en particulier dans la zone sous l'influence des racines, la rhizosphère, qui contient plus d'un million de microorganismes par gramme de sol. Les microorganismes trouvent en effet dans ce milieu des substrats énergétiques libérés par les racines et nécessaires à leur métabolisme : sucres, acides aminés, acides organiques, hormones... Certains de ces microorganismes, principalement des bactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes. Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria).

Les actinomycètes sont des micro-organismes PGPR capables de coloniser la rhizosphère grâce à leurs caractères antagonistes et compétitifs vis-à-vis des autres microorganismes du sol. Certains sont connus pour leur production de sidérophores qui permettent de chélater le fer ainsi privant le fer des autres microorganismes (Cao *et al.*, 2005 ; Getha *et al.*, 2005). La production de sidérophores par *S. griseorubiginouse* est efficace dans la lutte contre la fusariose du bananier causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubenese* (Getha *et al.*, 2005). D'autres sont parasites de champignons en produisant des enzymes qui leur permettent de dégrader la paroi des cellules fongiques ; le parasitisme des mycélia de champignons par les actinomycètes a été décrit dans plusieurs travaux (Yuan et Crawford, 1995 ; Kham *et al.*, 1997 ; Tréjo-Estrada *et al.*, 1998 ; El-Tarably *et al.*, 2000 ; Xiao *et al.*, 2002 ; El-Tarably et Sivasithampar, 2006 ; Errakhi *et al.*, 2007 ; Jain et Jain, 2007). Plusieurs enzymes chitinolytiques ont été identifiés chez certaines espèces d'actinomycètes dont *S. antibioticus* (1966), *S. lividens* (Miyashita *et al.*, 1991), *S. lydicus* WYEC108 (Mahadevan et Crawford, 1997), *S. plicatus* (Abd-Allah, 2001) et *S. halsteii* AJ-7 (Joo, 2005).

Les PGPR stimulent la croissance des plantes de différentes manières. Elles sont capables de coloniser la rhizosphère, volume du sol situé au voisinage immédiat des racines des plantes, en utilisant les exsudats racinaires comme substrats nutritifs, et ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante. Cet effet bénéfique peut être direct, lorsque la bactérie stimule la croissance racinaire *via* la production de phytohormones, la solubilisation du phosphate inorganique, la fixation symbiotique ou non de l'azote etc..., ou indirect, lorsqu'elle inhibe la croissance des organismes phytoparasitaires (antagonisme *via* production d'antibiotiques, d'antibactériens et/ou d'antifongiques, de chitinases, de sidérophores etc...). Par ailleurs, la symbiose associative (aptitude endophytique) entre la bactérie PGPB et sa plante hôte

améliore grandement l'efficacité du transfert de nutriments ou autres substances bénéfiques de la bactérie à la plante.

Une des particularités intéressantes des PGPR réside dans leur compétence rhizosphérique. Ceci correspond à leur capacité à coloniser la rhizosphère, les surfaces racinaires, à y survivre et y proliférer pendant une période considérable en présence ou non d'une microflore existante (Whipps, 1997 ; Bloemberg et Lugtenberg, 2001 ; Compant *et al.*, 2005a). Cette compétence est un pré-requis pour que les PGPR puissent présenter des effets sur leur plante hôte. En effet, une absence d'effet des PGPR, que ce soit dans un cas de biocontrôle ou de stimulation directe de croissance de la plante, a souvent été associée à une faible compétence des PGPR à coloniser la rhizosphère et les surfaces racinaires (Thomashow, 1996). Ceci a conduit à la recherche des PGPR présentant une forte compétence rhizosphérique mais également de PGPR pouvant entrer à l'intérieur de leur hôte végétal, lieu où elles peuvent être relativement protégées des conditions extérieures (Nowak et Shulaev, 2003).

Les effets des PGPR endophytiques sur la plante sont souvent plus prononcées que ceux des bactéries restreintes au niveau des surfaces racinaires (Conn *et al.*, 1997 ; Chanway *et al.*, 2000). En effet, lors de la colonisation endophytique, les PGPR internes ont une interaction plus proche avec les cellules végétales que les PGPR non endophytiques. Elles stimulent, de ce fait, davantage les défenses et la croissance de la plante (Nowak et Shulaev, 2003). Enfin, elles sont mieux protégées face aux stress biotique et abiotique que les épiphytes bactériens et interagissent ainsi plus longtemps avec leurs hôtes (Hallmann *et al.*, 1997). Ces bactéries PGPR présentent un grand intérêt scientifique et agronomique majeur car elles jouent un rôle important dans le fonctionnement biologique de la rhizosphère, et ont donc un effet important sur la croissance des plantes. L'effet PGPR offre donc des possibilités intéressantes pour une agronomie respectueuse de l'environnement. En effet, une meilleure connaissance et utilisation de ces populations bactériennes pourrait permettre une diminution des intrants phosphatés et des pesticides polluants dans les sols agricoles.

De nombreuses recherches ont été réalisées sur l'isolement des actinomycètes et leur utilisation comme agent de lutte biologique contre les phytopathogènes du sol. Cependant, les études portant sur la colonisation endophytique de la plante par les actinomycètes PGPR, le devenir des PGPR endophytiques au sein de la plante, ainsi que les mécanismes associés à leur colonisation méritent d'être étudiés. Tout d'abord d'un point de vue fondamental, afin d'analyser et de comprendre où se situent les bactéries, pourquoi elles se retrouvent dans certaines parties de la plante et quels sont les mécanismes de défense de la plante associés à leur colonisation. Ensuite de point de vue appliqué, car le consommateur, peut demander si ces microorganismes sont présents dans les parties de la plante destinées à sa consommation. Ainsi, l'étude de la colonisation de la plante par les PGPR endophytiques apparaît comme un pré-requis avant leur utilisation sur les plantes cultivées (Nowak et Shulaev, 2003).

D'après la littérature, la colonisation endophytique des PGPR au niveau racinaire peut se réaliser de différentes façons. Tout d'abord, la zone d'émergence des racines secondaires de la plante constitue une ouverture naturelle permettant l'entrée des PGPR à l'intérieur de la plante (Reinhold-Hurek et Hurek, 1998). Ensuite, les blessures provoquées par des facteurs biotiques, comme par exemple les agents pathogènes, peuvent également permettre l'entrée des PGPR (Lodewyckx *et al.*, 2002). Une autre possibilité consiste en la sécrétion, par ces microorganismes, d'enzymes dégradant les parois cellulaires de la plante telles que des cellulases, des endoglucanases, des polygalacturonases et des xylanases (Hallmann, 2001 ; Lodewyckx *et al.*, 2002 ; Gyaneshwar *et al.*, 2001). Cette sécrétion enzymatique est cependant de faible intensité et n'est pas une sécrétion continue qui détruirait les tissus de la plante. Elle permet ainsi juste à certains PGPR endophytiques d'entrer à l'intérieur de leur hôte végétal (Rosenblueth et Martinez-Romero, 2006). Suite à leur pénétration dans les racines, certaines PGPR endophytiques vont se propager dans différents tissus de leurs hôte (Whipps, 2001 ; Rosenblueth et Martinez-Romero, 2006 ; Sørensen et Sessitsch, 2006). La colonisation affecte tout d'abord le cortex racinaire par la voie intercellulaire et atteint ensuite la barrière de l'endoderme (Sprent et James, 1995 ; Reinhold-Hurek, 1998 ; Hallmann, 2001). Néanmoins, des cellules de l'endoderme sont détruites lors du développement des racines secondaires (Hallmann, 2001), ce qui facilite la propagation des PGPR endophytiques jusqu'au cylindre central. Les endophytes bactériens peuvent alors atteindre les vaisseaux conducteurs du xylème et les utiliser pour se propager jusqu'aux parties aériennes de la plante (Sprent et James, 1995 ; James *et al.*, 2002 ; Cocking, 2003). Cependant, il est important de considérer que cette migration des bactéries endophytes *via* les vaisseaux du xylème a fait

l'objet de beaucoup de discussions. Il a ainsi été rapporté par certains botanistes que les endophytes ne se propagent pas par le xylème, mais plutôt par l'apoplaste de ces vaisseaux, la lumière du xylème a bien été prouvée et diverses publications citent, ainsi, une propagation des endophytes par cette voie de colonisation (Hallmann, 2001 ; Compant *et al.*, 2005b).

Afin d'étudier la colonisation des PGPR endophytiques, il faut pouvoir visualiser ces microorganismes et les différencier de la microflore existante. De plus, des composés de la plante peuvent souvent être confondus avec des bactéries. Il apparaît de ce fait, primordial de les identifier sous conditions gnotobiotiques (environnement contrôlé où le seul micro-organisme présent est celui inoculé) (Hallmann, 2001), également sous conditions non stériles. Ceci est possible, notamment, grâce à des marqueurs moléculaires comme par exemple le gène *gfp* (pour “Green Fluorescent Protein”) codant pour la protéine verte fluorescente ou ses dérivés *egfp*, *cgfp* et *ygfp* (Larrañzar *et al.*, 2005) ou à des marqueurs chromogéniques comme le gène *gusA* codant la protéine GUS ou β-glucuronidase conférant une coloration bleue à la bactérie après ajout d'un substrat (Gamalero *et al.*, 2003 ; Jansson, 2003). Cependant, certaines particularités morphologiques remarquables des actinomycètes (mycélium aérien, mycélium de substrat, la production de pigments diffusibles...) offrent la possibilité d'étudier leur colonisation sous conditions gnotobiotiques sans avoir appel aux marqueurs.

Ainsi, dans ce deuxième article, nous avons évalué les compétences rhizosphériques et le pouvoir de colonisation épi- et endophytique de 9 souches d'actinomycètes isolées à partir du sol rhizosphérique de la vigne saine sauvage de 4 régions du Maroc (Loqman *et al.*, 2009). Ces souches sont sélectionnées pour leur meilleur effet antagoniste *in vitro* vis-à-vis de 5 champignons phytopathogènes y compris *Botrytis cinerea*, l'agent de la pourriture grise de la vigne. De plus, les résultats préliminaires obtenus par ces souches en matière de protection de vitroplantules de vigne vis-à-vis *B. cinerea*, suggèrent que ces souches peuvent être des PGPR présentant des compétences rhizosphériques mais également peuvent entrer à l'intérieur de leur hôte végétal en stimulant sa croissance ou ses défenses naturelles.

Pour ce faire, nous avons vérifié tout d'abord la capacité de ces souches de pousser sur un milieu à base d'extrait de plante de vigne comme seule source nutritionnelle et de garder sur le même milieu leurs pouvoirs antagonistes vis-à-vis *B. cinerea*. Les résultats obtenus montrent que 9 souches peuvent pousser sur ce milieu mais seule 5 présentent un pouvoir

antagoniste important vis-à-vis *B. cinerea*. Des observations microscopiques des hyphes de ce dernier prélevés au niveau de la zone de confrontation avec les actinomycètes antagonistes montrent des changements remarquables par rapport au témoin (dégradation partielle ou totale). Ceci a été confirmé par des observations réalisées en microscope à fluorescence en utilisant les colorants vitaux tels que le Red Nile et le Calcofluor white. Pour évaluer les compétences rhizosphériques, endophytiques et/ou de protection de ces 5 souches, on a inoculé par des suspensions cellulaires stérilement et sous conditions gnotobiotiques la rhizosphère de vitoplantules de vigne. Nous avons observé que ces 5 souches colonisent les surfaces racinaires, puis pénètrent dans les racines jusqu'aux feuilles. De plus, en présence de ces souches, les plantes ne présentent pas les symptômes de la pourriture grise. La pénétration intra-racinaire des actinomycètes et les défenses associées peuvent être corrélées à la sécrétion d'enzymes dégradant les parois cellulaires par les actinomycètes. Ainsi, nous avons démontré que 4 de ces 5 souches synthétisent des endoglucanases.

Les résultats importants obtenus par ces 5 souches ; compétences rhizosphériques, colonisations endophytiques, croissance et protection de la vigne, offrent donc des possibilités intéressantes pour une agronomie respectueuse de l'environnement avec moins ou sans produits phytosanitaires. En effet, une meilleure utilisation de ces populations bactériennes nécessite une meilleure compréhension des mécanismes qui interviennent pour stimuler la croissance et/ou les défenses de la plante.

Egalement, dans le troisième article, nous avons évalué d'autres caractéristiques PGPR des souches sélectionnées ; à savoir la capacité antagoniste de ces souches vis-à-vis d'autres phytopathogènes de la vigne, la production des molécules stimulant la croissance ou les défenses naturelles des plantes en condition de laboratoire. Par ailleurs, nous avons démontré que 4 des 5 souches pouvaient stimuler la croissance et de protéger des plantules de vigne (*Vitis vinifera* L), en modèle rhizosphérique contrôlé. Ainsi, les souches les plus performantes, *Streptomyces anulatus* (SS38 et SSh10) et *Micromonospora flavogrisea* (SS40), augmentaient respectivement la croissance de la plante de 80%, 76% et 73%.

Ces souches se sont avérées capables de produire des molécules de type acide indole acétique (AIA hormones capables de stimuler la croissance et les mécanismes de défense naturels des plantes). De plus, Ces souches peuvent aussi solubiliser le phosphate en milieu synthétique minimum (SMM) liquide et de produire des sidérophores et des chitinases.

Correlation between endophytic potential and anti-Botrytis activity of Actinomycetes isolated from rhizospherical Moroccan grapevine

Souad Loqman^{1,2}, Essaid Ait Barka¹✉, Christophe Clément¹, Yedir Ouhdouch²

(1) Laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes, Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne, UFR Sciences – UPRES EA 2069, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51687 Reims Cedex 2, France ¹

(2) Faculté de Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad (UCAM), Laboratoire de Biologie et de Biotechnologie des Microorganismes, Marrakech Maroc

Essaid Ait Barka

E-mail: ea.barka@univ-reims.fr

ABSTRACT

Biological control is an alternative to pesticides for protection against crop diseases. A key to progress in the field of biological control to protect grapevine against *Botrytis cinerea* is to select *in vitro* the best agent to be applied in the field. Patterns of colonization of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay plantlets by antagonistic actinomycete isolated from Moroccan Rhizosphere soil of healthy vineyard fields were studied under gnotobiotic conditions. Endophytic colonisation patterns were monitored by the presence of actinomycete in the tissues of the fifth leaf. Analysis of the actinomycete colonization patterns showed that this strain colonizes grapevine root. Furthermore, cell wall-degrading endoglucanase secreted by actinomycete explained how the bacterium gains entry into root internal tissues. The simultaneous *in vitro* co-culture of *B. cinerea* and actinomycete stop the spread of fungus, stimulate the growth and enhancement of the resistance of grapevine transplants. Microscopic observation of *B. cinerea* mycelium from the zone of contact between the fungus and with actinomycete on grapevine tissue extract agar shows a growth disruption of fungal mycelium. Evidence for physiological changes in these fungi was obtained by vital fluorescent staining with Calcofluor white and Nile red.

Keywords: Actinomycetes, endophytic potential, antifungal activity, *Botrytis cinerea*, *Vitis vinifera* L.

INTRODUCTION

The causal agent of grey mould, *Botrytis cinerea*, is a ubiquitous necrotrophic pathogen and can infect almost every plant part on a wide range of plants worldwide (Rosslenbroich and Stuebler, 2000). The control of this and other fungal diseases of grapevine is mainly by use of chemical fungicides. Widespread use of chemical fungicides has certainly decreased the incidence of fungal diseases, but at the same time has contributed to the appearance of fungicide-resistant strains of the pathogens. Due to consumer resistance to chemical residues in food and public concern for environmental safety, there is an increasing demand to develop alternative methods for disease control (Elad et al., 1991; Gerhardson et al., 2002).

In recent years, microbe-based biological control of plant-pathogenic fungi has increased in agricultural importance as replacements or supplements for agrochemicals, which may pollute the environment. Public concern about chemical pesticides has fostered an interest in application of bacteria for biological control to protect agricultural crops against pathogenic fungi. Microbe-based biological control of plant diseases has increased in agricultural importance as replacements or supplements for agrochemicals, which may pollute the environment and affect non-target organisms (Gerhardson et al., 2002; Welbaum et al., 2004).

One of the potential non-hazardous alternatives to the chemical fungicides is biological control, which consists of the use of biological processes to lower inoculum density of the pathogen in order to reduce crop loss (Beever et al., 1989; Thomashow et al., 1996; Larkin et al., 1998; Masih et al., 2000; Errakhi et al., 2007; Hamdali et al., 2008). To date, many promising microbes have been reported as candidate biocontrol agents against soilborne and airborne plant pathogenic fungi (Hallman et al., 1997; Sivasithamparam, 1998; Sturz et al., 2000; Bacon and Hilton, 2002; Mucciarelli et al., 2003; Narisawa et al., 2004; Jain and Jain, 2007).

Beneficial bacteria, known as plant growth-promoting rhizobacteria (PGRB) (Kloepper et al., 1991), colonize roots, enhance shoot emergence, and stimulate plant growth either directly, by producing plant hormones and improving nutrient uptake, or indirectly, by changing the microbial balance in the rhizosphere in the favor of the beneficial microorganisms (Nowak et al., 1989; Lazarovits and Nowak, 1997; Ait Barka et al., 2000, 2002; Compant et al., 2005a, 2005b). Plant growth-promoting bacteria are associated with many, if not all, plant species are commonly present in many environments and positive effects of plant-associated, beneficial bacteria have been demonstrated with annual crops such as wheat, soybean, lettuce, bean, maize, barley (Kloepper et al., 1991), potato (Nowak et al., 1998), and some woody plant species (Hallman et al., 1997; Sturz et al., 2000). The ability to colonize roots has been considered the major factor that determines inoculum efficacy both for crop yield enhancement and for disease control (Schroth et al., 1981; Weller, 1988). This has led to an emphasis on selection of plant-beneficial bacteria that are rhizosphere competent (Raaijmakers et al., 2001). In addition, there is ample evidence that bacteria can also colonize internal tissues and thrive as endophytes in roots and/or shoots and leaves (Dong et al., 2003; Garbeva et al., 2001; Hallman et al., 1997; Whipps, 2001).

Actinomycetes, especially *Streptomyces* spp., are among the most fascinating microorganisms. Actinomycetes are well-known isolated from the rhizosphere have been the focus for excellent biocontrol agents to soilborne plant diseases (Fabre et al., 1988; Tokala et al., 2002; Ikeda, 2003; El-Tarabily et al., 2000; Errakhi et al., 2007; Jain and Jain, 2007). Some actinobacteria are also known to inhabit the tissues of healthy plants. By cultivation-independent techniques based on 16S rDNA genes, the actinomycetes were found to colonize inside the roots of barley (Thirup et al., 2001) and stems of potato (Sessitsch et al., 2002). The actinomycetes resided in healthy plant tissues without causing symptoms of disease were defined as endophytic actinomycetes. The first endophytic actinomycetes studied from non-

leguminous plants (Benson et al., 1993). Other endophytic actinomycetes such as *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Microbispora*, and *Streptosporangium* strains were isolated surface-sterilized roots of different plant species in Italy (Sardi et al., 1992) and of maize in Brazil (Araujo et al., 2000). The use of endophytic actinomycetes as bicontrol agents of soil-borne roots disease is of interest through their ability to colonize healthy plant tissue and produce antibiotics in situ (Kunoh et al., 2002; Cao et al., 2004; Conn et al., 2008).

Nine antagonistic actinobacteria isolates from four Moroccan Rhizosphere soil of healthy vineyard fields (Tinjdad, Skoura, Sahara, and Errachidia), previously selected for their ability to control the grapevine gray mould (Loqman et al., 2009) *in vitro* and *in vivo*. This study was also designed to survey endophytic actinomycetes in grapevine for use as a biocontrol agent during the cultivation of tissue-cultured plantlets because of recent studies on the potential of endophytic actinomycetes as biocontrol agents.

The effect of the suppressive strains on the growth of the pathogen was determined by an *in vitro* plate assay. Protection from gray mould caused by *B. cinerea* was tested under controlled environmental.

MATERIAL AND METHODS

Actinomycete strains

Nine actinomycete strains used in this study were isolated from rhizospheric soil of healthy vineyard from four different Moroccan fields (Tinjdad, Skoura, Sahara, and Errachidia). Among these, two (SSh10, SSh18) isolates originate from Sahara, seven from Skoura (SS5, SS6, SS22, SS27, SS38, SS39 and SS40). The sequencing of the 16S RNA of these strains confirmed this classification; SSh10 and SS38 isolates exhibited 98% and 99% sequence identity to *Streptomyces anulatus*, respectively. SSh18, SS6, SS22 and SS27 isolates exhibited 98% sequence identity to, *Streptomyces endosymbiont of philanthus venustus*, *Streptomyces fimicarius*, and *Candidatus Streptomyces philanthi biovar basilaris* respectively. SS5, SS39 and SS40 exhibited 98% sequence identity to *Micromonospora flavogrisea*. Previously characterized and selected for their ability to control the grapevine gray mould (Loqman et al., 2009). Actinomycete spores from the selected strains were stored in 20% sterile glycerol at -20 °C.

Botrytis cinerea culture

The *B. cinerea* strain 630 used in this experiment was provided by Dr. Bryggo (INRA, Paris, France). Filamentous fungi were maintained on potato dextrose agar medium (PDA). Fungal inoculum was prepared by growing the fungus for one week on fresh PDA medium. After this period, the *B. cinerea* isolate had developed abundant hyphal swellings. The mycelium was removed aseptically from the PDA plates and was briefly homogenized in a disinfected blender in the presence of sterile distilled water. The density of the fungal inoculum was determined and the concentration of the fungus was adjusted to 10^5 spores ml⁻¹.

Confrontation tests

The actinomycetes were inoculated on the sides of the Petri dishes containing the grapevine tissue extract agar (1 kg sheath chopped into small pieces was submersed in 1000 ml boiling tap water for 1 h and 15 g agar was added filtrates). After inoculation at 28 °C for 4 days, *Botrytis cinerea* was inoculated on the centre of the Petri plates. After 4 days under the same culture conditions, the distance between the edge of actinomycete colony and the edge of fungal colony was evaluated for evidence of inhibition.

In order to test the effect of actinomycete on *B. cinerea* structure, a thin layer of fungal mycelium was aseptically removed from the zone of contact between the isolate and *B. cinerea* and placed in a drop of sterile water on a microscope glass slide. A cover slip was placed on the film, and observations were made under the microscope (Model BH2, Olympus, Japan).

Fluorescent staining of *Botrytis cinerea* mycelium

For vital observations, mycelium of *B. cinerea* was stained with two vital fluorescent stains, Calcofluor white (Sigma F-3397) and Nile red (Sigma N-3013). Stock solutions of the stains were made at 1 mg ml⁻¹ for Nile red in DMSO while Calcofluor white (Sigma Fluorescent Brightener 28) was made at 1 mg ml⁻¹ in 50 mM phosphate buffer. The working concentration in staining solutions (μ l stock solution ml⁻¹ MilliQ water) and staining times were 15 min for Calcofluor white at 3 μ l ml⁻¹, and 20 min for Nile red at 2 μ l ml⁻¹. The effect of actinomycete on vitality of *B. cinerea* was tested by adding the fluorescent stains to fungus mycelium in eppendorf. Three replicates per treatment were performed.

Plant material and in vitro growth conditions

Disease-free plantlets of *Vitis vinifera* L. ‘Chardonnay’ were obtained by growing nodal explants on Murashige and Skoog medium (1962). Vitroplantlets were grown under 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ white fluorescent light for a 16 h photoperiod at 25 °C day and night temperatures. Multiplication was done in 25-mm-diameter test tubes containing a 15 mL medium. In each of the following experiments 24 nodal explants were used per treatment.

In vitro bacterization with Actinomycetes

The bacterial inoculum was produced by transferring two loops of actinomycetes to 60 ml Bennett liquid medium in a 250 ml Erlenmeyer flask and incubated at 28°C at 150 rpm for 4 days as previously described (Barakate et al., 2002). Bacteria were collected by centrifugation (3000xg, 15 min) and washed twice with phosphate saline buffer (PBS) (pH 6,5). The pellet was resuspended in the same PBS buffer and then used as inoculum. About 1-cm-long nodal explants, taken from 6-week-old plantlets with removed leaves, were dipped in the inoculum for 1 min, blotted with sterile filter paper, and propagated on Murashige and Skoog medium as above. Nonbacterized controls were dipped only in PBS. The plants were grown in the growth chamber as above.

In vitro growth responses of the first and second and third plantlet generations after inoculation

Inoculated plantlets (first generation) were subcultured *in vitro* obtain the second generation. Inoculation was carried out only on the initial explants, not on the second and the third generation explants.

Endophytic colonization

To determine endophytic colonization, plantlets were removed from the agar and the roots were gently rinsed in sterile distilled water. The samples were surface sterilized with 70% ethanol for 5 min, followed by 1% commercial bleach and a 0,01% Tween 20 solution for 1 min, and then washed three times in distilled water (1 min each time).

Analysis of the cell wall-degrading enzymes activities

Enzyme activities were determined by the method of the Reinhold-Hurek et al (1993), with some modification. Briefly, plates containing Bennett solid medium, with either 0,2% carboxymethyl cellulose (CMC) or 0,5% polygalacturonic acid, were spot inoculated with actinomycetes and incubated at 30°C for 4 days. Then the cells were removed from the plates, and the CMC-containing plates were stained Congo red (0,1%) for 30 min; this was followed by several washes with 1M NaCl to improve the contrast (Reinhold-Hurek et al., 1993). Similarly, the polygalacturonic acid-containing plates were stained with ruthenium red (0,1%) and washed with 1M NaCl (McKay, 1988). Endoglucanase (CMC-degrading cellulase) activity was determined by the appearance on a red background of clear yellowish halos around the points where the actinomycete was inoculated (Reinhold-Hurek et al., 1993). Endopolygalacturonase activity was determined by the appearance of intence purple-red halos on a colorless background at the point where the bacterium was inoculated (McKay, 1988).

Statistical analyses

The experiment unit in all experiment was an individual plant, contained in test tubes. Plants (24) were evaluated per treatment. An antagonistic test was done using six plates for each treatment. All experiments were repeated three times.

RESULTS AND DISCUSSION

Microorganisms living within plant tissues for all or part of their life cycle without causing any visible symptoms of their presence are defined as endophytes (Wilson, 1993; Saikkonen et al., 2004). They inhabit majority of healthy and symptom less plants, in various tissues, seeds, roots, stems and leaves (Johri, 2006). Plants benefit extensively by harbouring these endophytic microbes; they promote plant growth (Compant et al., 2005) and confer enhanced resistance to various pathogens (Clay and Schardl, 2002; Höflich, 2000; Arnold et al., 2003) by producing antibiotics (Ezra et al., 2004). Endophytes also produce unusual secondary metabolites of plant importance (Taechowisan et al., 2005). In the present study, the nine selected actinomycetes can grow on the grapevine tissue extract agar as sole nutrient sources and only five (SS38, SS40, SS39, SS22 and SSh10) showed high antagonistic activity against *B. cinerea* in the same medium (Fig. 1). These strains can also grow in grapevine plant tissues and produce antifungal metabolites in situ, suggesting that antibiosis may be one of the mechanisms controlling this pathogen. Recently, examination under the light microscope showed litter decomposer fungal colony margins adjacent to the actinomycetes colonies showed the lysing of hyphae and aborted hyphae of germinating spores (Jayasinghe and Parkinson, 2008). There are many reports related to antibiotic substances which induced malfunctions such as stunting, distortion, swelling, hyphal protuberances or highly branched appearance of fungal germ tubes (Gunji et al., 1983; Getha and Vikineswary, 2002).

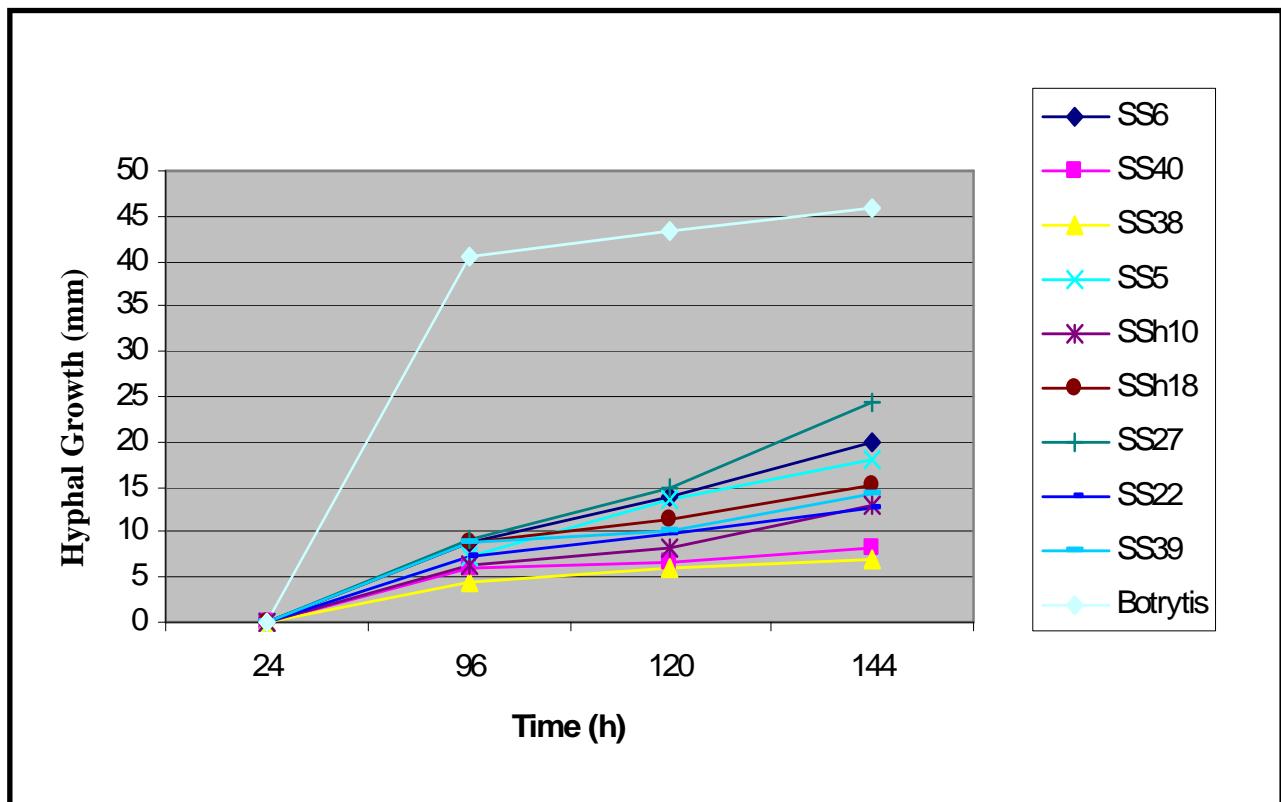


Figure 1: Effect of Actinomycetes on hyphal mycelium growth when inoculated together on grapevine tissue extract agar medium.

The microscopic observations of *B. cinerea* mycelium derived from 7-day-old co-culture of actinomycete/fungus showed a marked morphological changes and severe structural alterations of the fungal mycelium in the presence of actinomycetes. The mycelium appeared degraded, with large vesicles inside the cell walls (Fig. 2). In many cases, the mycelium cells had either no cytoplasm or the cytoplasm was depleted of organelles (Fig. 2d-e). These results are in line with earlier observation of several sections of the invading hyphae, which displayed various levels of cellular disorganization that ranged from wall loosening to cytoplasm disintegration, as a result of biological control agent treatment (Masih et al., 2000). Several studies reported that *B. cinerea* mycelium presents severe morphological changes characterized by excessive branching and swelling of the cell wall when fungus was co-cultured with antagonists (Larkin and Fravel, 1998; Ait Barka et al., 2002). The staining of walls and membranes with Calcofluor white and Nile red could easily see structural changes in mycelia. Calcofluor white is commonly used to stain chitin and glucan-containing cell walls in fungi (Reed et al., 1997) and growth patterns as hyphal branching may thus be easily observed in the treated hyphae (Fig. 3B). The stain showed excellent wall staining in all the fungi and septation and the hyphal from could easily be studied at a higher magnification. Nile red stains hydrophobic components of cell walls and intracellular membranes including lipid bodies (Yuan et al., 1991). Wall and membranes structures were invisible in the treated hyphae (Fig 3D) compared to those untreated (Fig. 3C).

Our past studies clearly demonstrated the potential of nine selected actinomycetes to inhibit mycelia growth *in vitro* and in planta as shown by the healthy plantlets despite the presence of *B. cinerea* (Loqman et al., 2009). Also, when plant inoculated only with actinomycetes isolates were sampled several weeks later. In the present study, five of the nine selected isolates presented the same potential and pattern to suppress the attack of plantlets by *B. cinerea*. To avoid redundancy, only results obtained with SS38 isolates will be presented

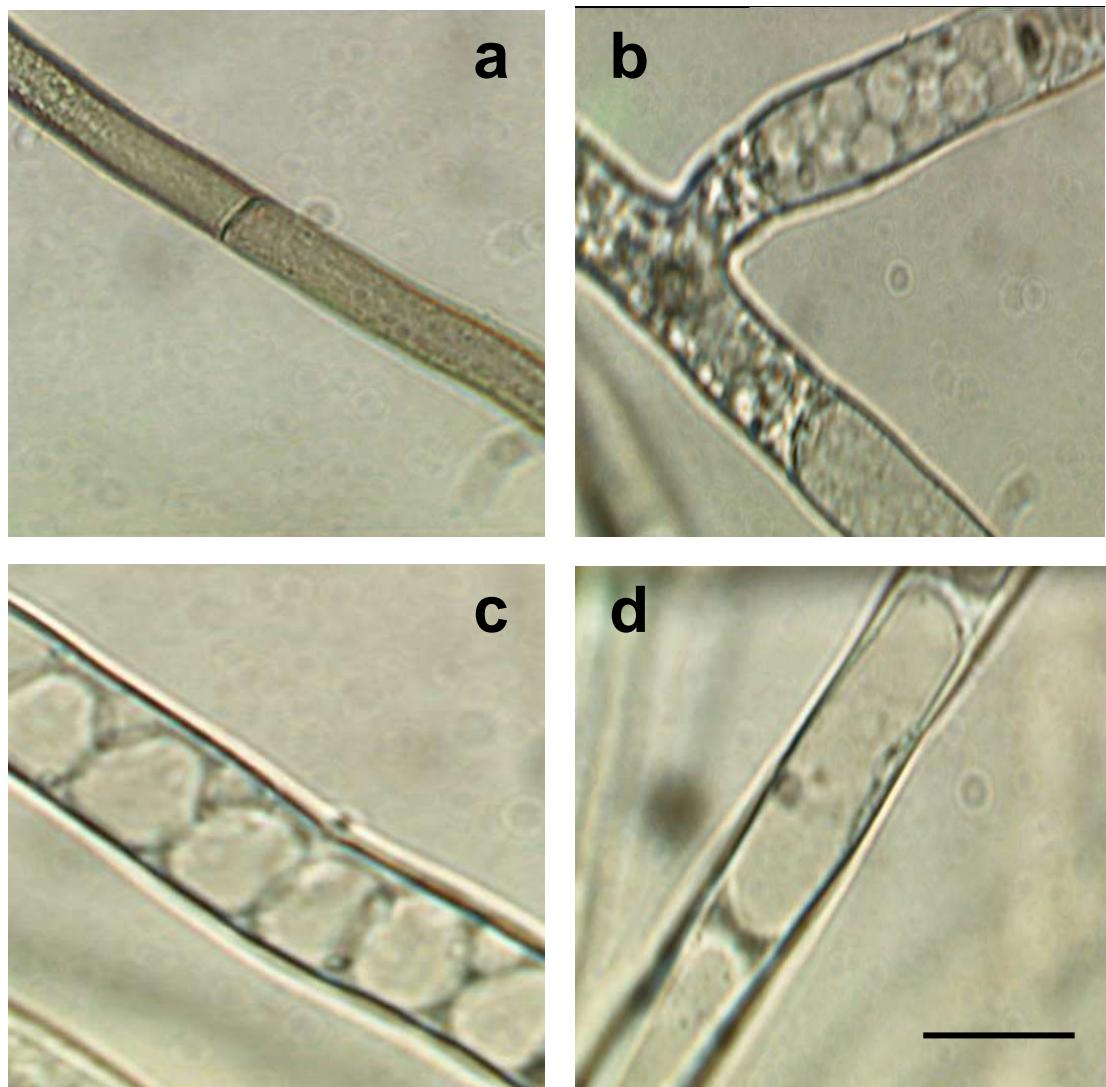


Figure 2: Hyphal mycelium from the zone of interaction between *B. cinerea* and actinomycetes isolates. a: Normal hypha of *B. cinerea*. b-d: Mycelium taken in the zone of interaction between *B. cinerea* and *Streptomyces anulatus*-related strain (SS38). b: Partially emptied mycelium. c: Big vesicles in the mycelium. d: Emptied mycelium (arrow). Bar = 40 μm (a), 100 μm (b-d).

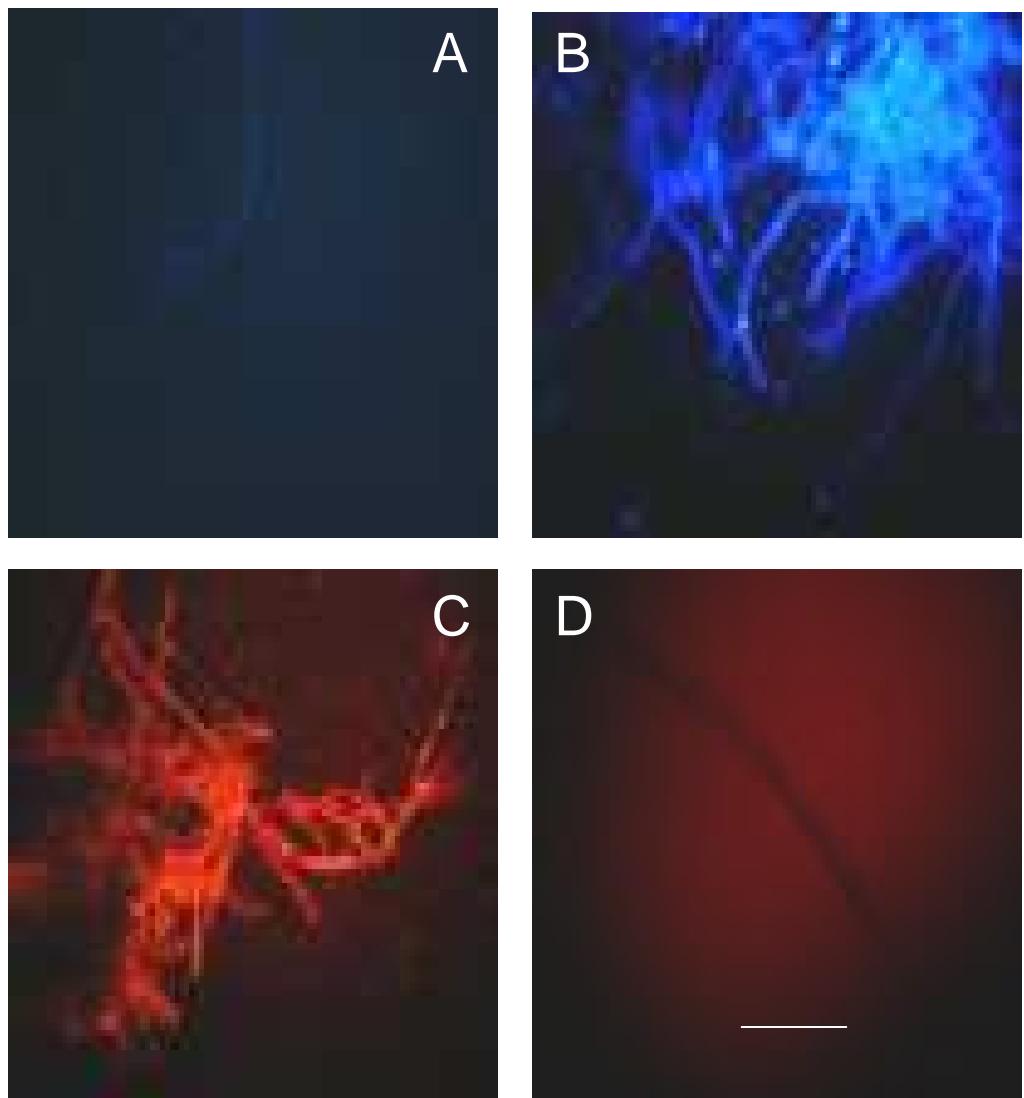


Figure 3: *Botrytis cinerea* hyphae stained with Calcofluor white (A-B) and Nile red (C-D). (B-D) effect of actinomycete on fungal hyphae. (A-C) Untreated fungi. Bar=40 μm .

here. Selected isolates capable of establishing endophytic and epiphytic populations, allowing clonal multiplication of plantlets by nodal explants in *perpetuum* without the need for re-inoculation (Fig. 4A). The response of plant toward bacterization was maintained and amplified after the second and the third generation. Several studies reported an identical behavior with potato (Frommel et al., 1991a), tomato (Pillay and Nowak, 1997) or grapevine (Ait Barka et al., 2002). Furthermore, as endophyte, the actinomycete has the advantages of escaping microbial competition and influencing the host's response to pathogens attack. To prove the presence of endophyte actinomycete inside the leaf tissues, disk of fifth leaves from bacterized plantlets were deposited on Bennett medium. After 4 days of incubation, colonies of bacteria were observed around bacterized leaf and tissues (Fig. 4B-b).

Vitroplants of Chardonnay are susceptible to fungal attack. When inoculated with *B. cinerea*, they produced characteristic gray mold symptoms within 7 days (Fig. 5e). In contrast, under the same inoculation and growth conditions, endophyte actinomycete bacterized vitroplants appeared healthy (Fig. 5c). Similar responses were reported cotton (Chen et al., 1995), peas (Benhamou et al., 1996), potatoes (Sturz et al., 1999), and wheat (Coombs et al., 2004). They can also increase nitrogen fixation they can also increase nitrogen fixation in wild rice (Elbeltagy et al., 2001) and accelerate seed emergence, and endophytes isolated from oilseed rape and tomato have the ability to improve seed germination seedling length, and plant growth (Nejad et al., 2000). Actinomycetes were chronologically detected first on root surfaces, then in root internal tissues, and finally in the fifth leaf. Moreover, the presence of actinomycete in the root tips (Fig. 4B-a) after inoculation also supports the possibility of entry *via* root tips.

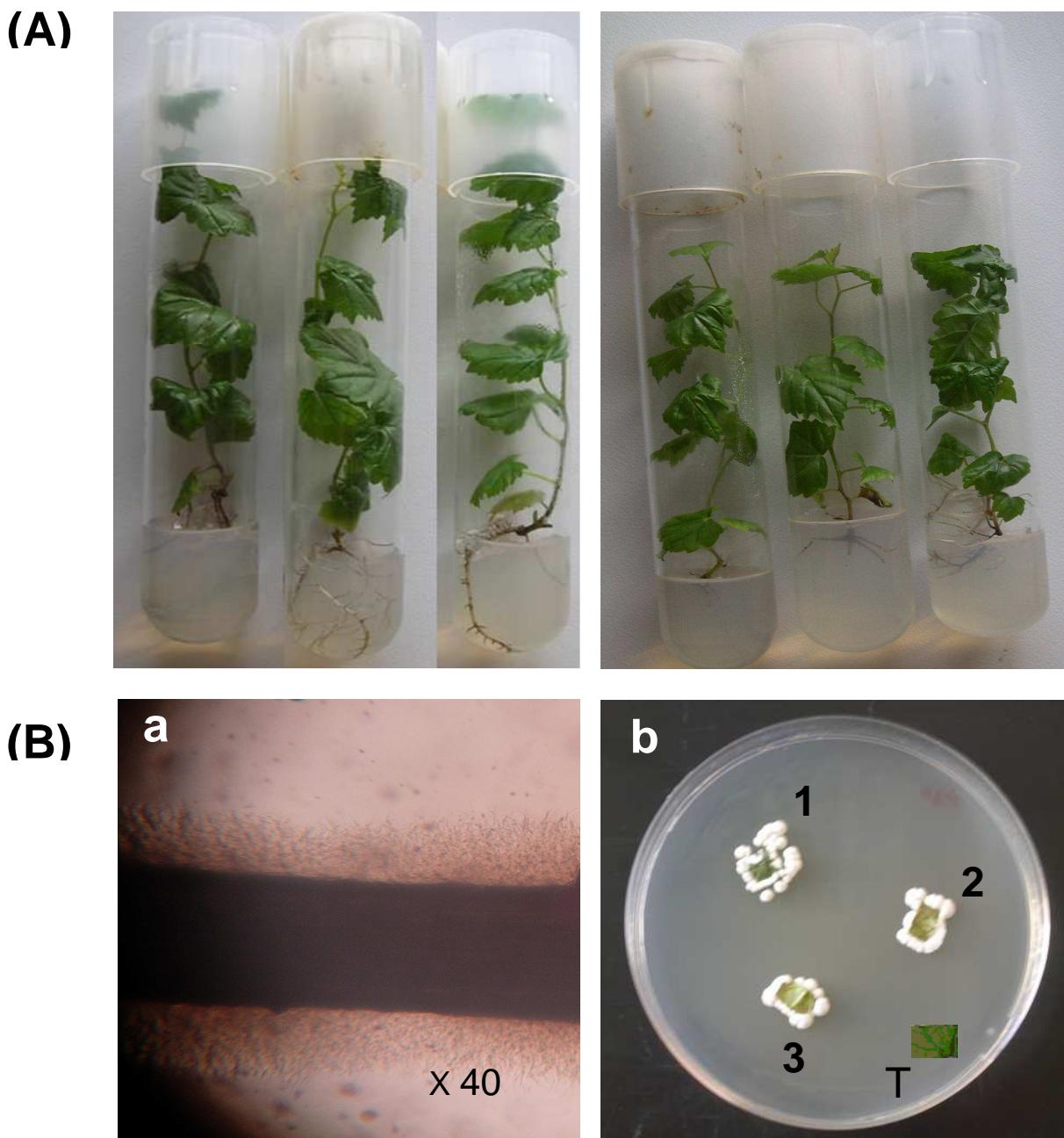


Figure 4: (A) *In vitro* responses of grapevine plantlets co-cultured with *Streptomyces anulatus*-related strain (SS38); (B-a) Microscopic observation showing emergence of SS38 mycelia from disinfected root cuttings (B-b) test of the presence of Actinomycete colonies in leaf tissues sampled from bacterized plantlets after four days of incubation on solid Bennett medium; (1) First generation, (2) Second generation, (3) Third generation, (T) control plantlets.

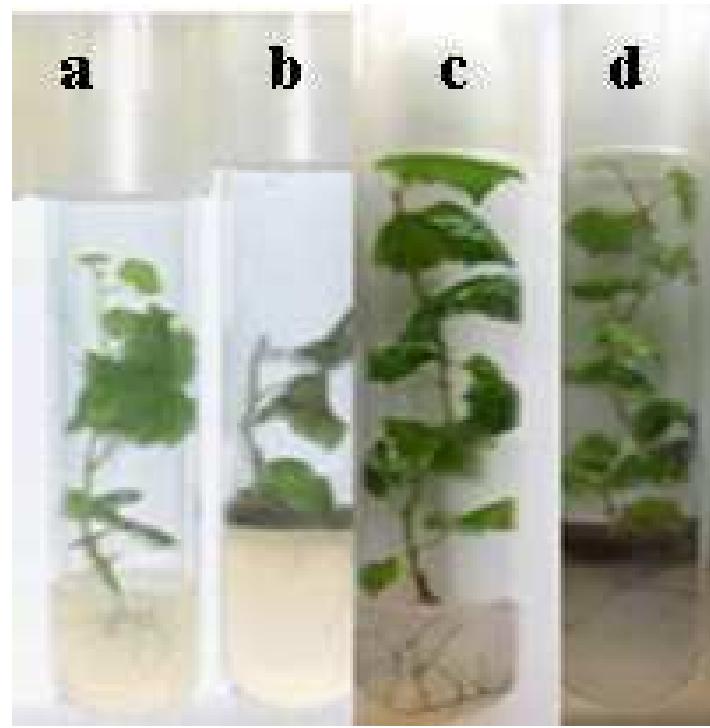


Figure 5: Grapevine plantlets: (a) nonbacterized plantlets; (b) nonbacterized plantlets + *B. cinerea*; (c) Bacterized plantlets with *Streptomyces anulatus*-related strain (SS38); (d) bacterized plantlets + *B. cinerea*.

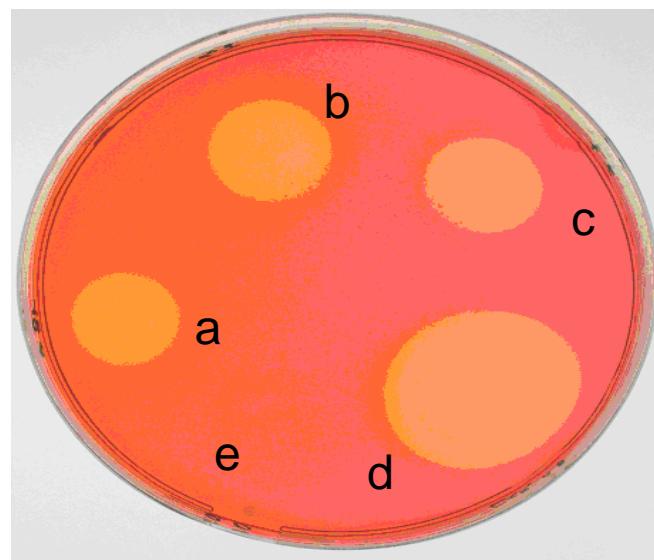


Figure 6: Photographs of endoglucanase activities of (a) *Micromonospora flavogrisea*-related strain (SS40); (b) *Streptomyces fimicarius*-related strain (SS22); (c-d) *Streptomyces anulatus*-related strain (SSh10) and (SS38) respectively; (e) *Micromonospora flavogrisea*-related strain (SS39).

This conclusion is supported by the production of the cell wall-degrading enzymes endoglucanase by four of the five selected endophytes actinomycetes (Fig. 6), *Streptomyces anulatus*-related strain (SS38 and SSh10), *Streptomyces fimicarius*-related strain (SS22) and *Micromonospora flavogrisea*-related strain (SS40) with hay production of the cell wall-degrading enzymes endoglucanase by *Streptomyces anulatus*-related strain (SS38) (Fig. 6d). It has been reported that the production of cell wall-degrading enzymes by endophytic bacteria is usually linked to localized host plant defense (Hallman et al., 1997; Compant et al., 2005).

Our data demonstrate that *in vitro* bacterization of grapevine plantlets can be used as a new strategy for preventing the spread of gray mold disease; however, the mechanism of this preventative and growth stimulation needs to be clarified. Our model presents the advantage to increase our understanding on the contribution of endophytically resident actinomycete to plant-pathogen interaction. Furthermore, it makes biological control by means of endophytes an attractive possibility, especially as an alternative to the control of plant pathogens by fungicidal compounds, whose efficacy has proven to be unsatisfactory.

REFERENCES

- Ait barka, E., Belarbi, A., Hachet, C., Nowark, J., Audran, J.C., 2000. Enhancement of *In vitro* growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera L.* co-cultured with plant growth -promoting rhizobacteria. FEMS Microbiol. Lett. 186,91-95.
- Ait Barka, E., Gognies, S., Nowak, J., Audran, J.C., Belarbi, A., 2002. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. Biol. Control 24,135-142.
- Araujo, J.M., Silva, A.C., Azevedo, J.L., 2000. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays L.*). Brazilian Archives of Biology and Technol. 43, 447-451.
- Araujo, W. L., Maccheroni, W., Aguilar-Vidoso, C. I. and Barroso, P. A. V., 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus root stocks. Can. J. Microbiol. 47,229-236.
- Araujo, W. L., Marcon, J., Maccheroni, W., van Elsas, J. D., van Vuurde, J. W. L., Azevedo, J. L., 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. Appl. Environ. Microbiol. 68,4906-4914.
- Arnold, A.E., Mejía, L.C., Kyllo, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N. and Herre, E.A., 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100, 15649-15654.
- Bacon, C.W., Yates, I.E., Hinton, D.M., Meredith, F., 2001. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. Environ. Health Perspect. 109 (2), 325-332.
- Barakate, M., Ouhdouch, Y., Oufdou, K., Beaulieu, C., 2002. Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. World J. Microbiol. Biotechnol. 17, 49-54.

- Beever, R.E., Laracy, E.P., Pak, H.V., 1989. Strains of *Botrytis cinerea* resistant to dicarboximide and benzimidazole fungicides in New Zealand vineyards. Plant Pathology 38, 427-437.
- Benhamou, N., Kloepper, J. W., Quadt-Hallmann, A. and Tuzun, S., 1996. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. Plant Physiol. 112, 919-929.
- Bennett, R.N., Wallsgrove, R.M., 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. New Phytologist 127, 617-633.
- Benson, D.R., Silvester, W.B., 1993. Biology of Frankia strains actinomycete symbionts of actinorhizal plant. Microbiological Reviews 57, 293-319.
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H., Zhou, S., 2004. Isolation and characterization of endophytic Streptomyces strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. Lett. Appl. Microbial. 39, 425-430.
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H., Zhou, S., 2005. Isolation and characterization of endophytic Streptomyces antagonists of Fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. FEMS Microbiol Lett 247:147-152.
- Chen, C., Bauske, E. M., Musson, G., Rodriguez-Kabán, R. and Kloepper, J. W., 1995. Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. Biol. Control 5, 83-91.
- Clay, K. and Schardl, C., 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. Am. Nat. 160, 99–127.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. and Barka, E.A., 2005a. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Appl. Environ. Microbiol. 71, 4951-4959.

- Complant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C. and Ait Barka, E., 2005b. Endophytic colonization of *Vitis vinifera L.* by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1685-1693.
- Conn, V.M., Walker, A.R., Franco, C.M.M., 2008. Endophytic actinobacteria induce defence pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 208-218.
- Coombs, J.T., and Franco, C.M.M., 2003. Visualization of an endophytic Streptomyces species in wheat seed. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4260-4262.
- Coombs, J.T., Michelsen, P.P. and Franco, C.M.M., 2004. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biol. Control* 29, 359-366.
- Dong, H., Li, W., Zhang, D. and Tang, W., 2003. Differential expression of induced resistance by an aqueous extract of killed *Penicillium chrysogenum* against Verticillium wilt of cotton. *Crop Protect.* 22, 129-134.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T., Isawa, T., Mitsui, H. and Minamisawa, K., 2001. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5285-5293.
- El-Tarably, K.A., Soliman, M.H., Nassar, A.H., Al-Hassani, H.A., Sivasithamparam, K., McKenna, F., Hardy, G.E. St. J., 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathology* 49, 573–583.
- El-Tarably, K.A., Sivasithamparam, K., 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol. Bioch.* 34, 1-16.
- Errakhi, R., Bouteau, F., Lebrihi, A., Barakate, M., 2007. Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for

damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). World J. Microbiol. Biotechnol. 23, 1503-1509.

Ezra, D., Hess, W.M. and Strobel, G.A., 2004. New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus; Microbiology 150, 4023-4031.

Fabre, B., Armau, E., Etienne, G., Legendre, F., Tiraby, G., 1988. A simple screening method for insecticidal substances from actinomycetes. J. Antibiot. (Tokyo) 41, 12-219.

Frommel, M.I., Nowak, J. and Lazarovits, G., 1991. Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grow potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. Plant Physiol. 96, 928-936.

Garbeva, P., Overbeek, L.S., van Vuurde, J.W. and van Elsas, J.D., 2001. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA-based PCR fragments. Microb. Ecol. 41, 369-383.

Getha, K., Vikineswary, S., 2002. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. J. Ind. Microbiol. 28, 303-310.

Green, H., Larsen, J., Olsson, P.A., Jensen, D.F. and Jackson, I., 1999. Suppression of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* by mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in root-free soil. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1428-1434.

Gunji, S., Arima, K., Beppu, T., 1983. Screening antifungal activities according including morphological abnormalities. Agric. Biol. Chem. 47, 2061-2069.

Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. and Kloepffer, J.W., 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Can. J. Microbiol. 43, 895-914.

- Hamdali, H., Bouizgarne, B., Hafidi, M., Lebrihi, A., Virolle, M.V., Ouhdouch, Y., 2008. Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Appl. Soil. Ecol.* 38, 12-19.
- Höflich, G., 2000. Colonization and growth promotion of nonlegumes by Rhizobium bacteria. *Microbial Biosystems: New Frontiers*; in Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology (eds) Bell, C.R., Brylinsky, M. and Johnson-Green, P. (Halifax: Atlantic Canada Society for Microbial Ecology) pp. 827-830.
- Ikeda, T., 2003. Pharmacological effects of ivermectin, an antiparasitic agent for intestinal strongyloidiasis: its mode of action and clinical efficacy. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 122, 527-538.
- Jain, P.K., Jain, P.C., 2007. Isolation, characterization and antifungal activity of *Streptomyces sampsonii* GS 1322. *Indian J. Exp. Biol.* 45, 203-206.
- Jayasinghe, D.B.A.T, Parkinson, D., 2008. Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. *Appl. soil ecology* 38, 109-118.
- Johri, B.N., 2006. Endophytes to the rescue of plants. *Curr. Sci.* 90, 1315–1316.
- Kloepper, J.W., Zablotowicz, R.M., Tipping, E.M. and Lifshitz, R., 1991. Plant promotion mediated by rhizosphere colonizers. In: Keister, D.L., Cregan, P.B. (Eds.), *The Rhizosphere and Plant Growth*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 315-326.
- Kunoh, H., 2002. Endophytic actinomycetes: attractive biocontrol agents. *Journal of General Plant Pathology* 68, 249-252.
- Larkin, R.P, Fravel, R., 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of Tomato. *Plant Dis.* 82, 1022-1028.
- Lazarovits, G., Nowak, J., 1997. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. *HortScience* 32, 188-192.

- Loqman, S., Ait Barka, E., Clément, C., Ouhdouch, Y., 2009. Antagonistic actinomycetes from Moroccan saoil to control grapevine gray mold. World J. Microbiol. Biotechnol. 28: 81-91.
- Masih, E.I, Alie, I., Paul, B., 2000. Can the grey mould disease of the grape-vine be controlled by yeast? FEMS Microbiol. Lett. 189, 233-237.
- McKay, A.M., 1988. A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretions. FEMS Microbiol. Lett. 56, 355-358.
- Mucciarelli, M., Scannerini, S., Berte, C., Maffei, M., 2003. *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. New Phytologist 158, 579-591.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium of rapid growth and biomass assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497.
- Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D. and DBfago, G., 1995. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO with enhanced antibiotic production. Plant Pathol. 44, 4-50.
- Narisawa, K., Usuki, F., Hashiba, T., 2004. Control of *Verticillium* yellows in Chinese cabbage by the dark septate endophytic fungus LtVB3, Phytopathology 94, 412-418.
- Nejad, P., and Johnson, P.A., 2000. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. Biol. Control 18, 208-215.
- Nowak, J., 1988. Benefits of *in vitro* “biotization” of tissue cultures with microbial inoculants. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 34, 122-130.
- Nowak, J., Asiedu, S.K., Bensalim, S., Richards, J., Stewart, A., Smith, C., Stevens, D., Sturz, A.V., 1998. From laboratory to applications: challenges and progress with *in vitro* dual culture of potato and beneficial bacteria. Plant Cell Tissue Organ Cult. 52, 97-103.

- Okamoto, M., Sato, M., Sato, Z. and Isaka, M., 1998. Biocontrol of *Phytophthora capsici* by *Serratia marcescens* F-1-1 and analysis of biocontrol mechanisms using transposon-insertion mutants. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64, 287-293.
- Ouhdouch, Y., Barakate, M., Finace, C., 2001. Actinomycetes from Moroccan Habitats: Screening for antifungal activites. Eur. J. soil Biol. 37,1-6.
- Raaijmakers, J.M. and Weller, D.M., 2001. Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp.: characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96. Appl. Environ. Microbiol. 67, 2545-2554.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Claeysens, M., and van Montagu, M., 1993. Cloning, expression in *Escherichia coli*, and characterization of cellulolytic enzymes of *Azoarcus* sp., a root invading diazotroph. J. Bacteriol. 175, 7056-7065.
- Reinhold-Hurek, B. and Hurek, T., 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. Trends in Microbiol. 6, 139-144.
- Rosslenbroich, H., Stuebler, D., 2000. *Botrytis cinerea* – history of chemical control and novel fungicides for its management. Crop Prot. 19, 557-561.
- Saikkonen, K., Faeth, S.H., Helander, M. and Sullivan, T.J., 1998. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. Ann. Rev. Ecol. Sys. 29, 319-343.
- Sardi, P., Saracchi, M., Quaroni, S., Petrolini, B., Borgonovi, G.E. and Merli, S., 1992. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2691-2693.
- Schroth, M.N. and Hancock, J.G., 1981. Selected topics in biological control. Ann. Rev. Microbiol. 35, 453-476.
- Sessitsch, A., Reiter, B., Pfeifer, U. and Wilhelm, E., 2002. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. FEMS Microbiol. Ecol. 39, 23-32.

- Sivasithamparam, K., 1998. Root cortex-the final frontier for the biocontrol of root-rot with fungal antagonists: a case study on a sterile red fungus. Ann. Rev. Phytopathol. 36, 439-452.
- Sturz, A.V., Christie, B.R., Matheson, B.G., Arsenault, W.J., and Buchanan, N.A., 1999. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. Plant Pathol. 48, 360-369.
- Sturz, A.V. and Nowak, J., 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. Appl. Soil Ecol. 15, 183-190.
- Taechowisan, T., Perberdy, J.F., Lumyong, S., 2004. PCR cloning and heterologous expression of chitinase gene of endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130. J. Gen. Appl. Microbiol. 50, 177-82.
- Tokala, R.P., Strap, J.L., Jung, M.C., Crawford, D.L., Salove, M.H., Deobald, L.A., Bailey, F.J., Morra, M.J., 2002. Novel plant microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces Lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). Appl. Environ. Microbiol. 68, 2161-2171.
- Welbaum, G., Sturz, AV., Dong, Z. and Nowak, J., 2004. Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. Crit. Rev. Plant Sci. 23, 175-193.
- Weller, D.M., van Pelt, J.A., Mavrodi, D.V., Pieterse, C.M.J., Bakker, P.A.H.M. and van Loon, L.C., 2004. Induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)-producing *Pseudomonas fluorescens*. In: Annual Meeting of The American Phytopathological Society, <http://www.apsnet.org/meetings/2004/abstracts/a04ma0738.htm>.
- Whipps, J.M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. J. Exp. Bot. 52 487-511.

Williams, S.T., Lanning, S., and Wellington, E.M.H., 1984. Ecology of actinomycetes, In: Goodfellow, M., Mordarski, M., and Williams, S.T. (Eds.), The Academic Press, London, United Kingdom, p. 481–528.

Yuan, W.M., Crawford, D.L., 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC1 08 as potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. Appl. Environ. Microbiol. 61, 3119-3125.

Growth promoting effect on *Vitis vinifera* L. of antagonistic actinomycetes isolated from rhizospherical Moroccan grapevine.

Souad Loqman^{1,2}, Essaid Ait Barka¹, Christophe Clément¹, Yedir Ouhdouch²✉

(1) Laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes, Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne, UFR Sciences – UPRES EA 2069, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51687 Reims Cedex 2, France¹

(2) Faculté de Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad (UCAM), Laboratoire de Biologie et de Biotechnologie des Microorganismes, Marrakech, Maroc

Address of correspondence: Yedir Ouhdouch.

Address: Faculté de Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, Département de Biologie, Laboratoire de Biologie et de Biotechnologie des Microorganismes, Avenue Prince My. Abdellah, BP 23 90, Marrakech 40 000, Morocco.

Telephone: +212 2 43 46 49

Fax number: +212 2 43 74 12

E-mail address: ouhdouch@ucam.ac.ma

Abstract

In order to select Actinobacteria that could improve plant growth and thus agricultural yield, we assessed different plant growth promoting (PGP) abilities of five Actinomycete isolates originating from four rhizospheric soil of healthy vineyard from 4 different Moroccan fields (Tinjdad, Skoura, Sahara, and Errachidia) that had been selected for their ability to control the grapevine gray mould, for their rhizospherical competence and endophytic potential. We first demonstrated that all of these strains were able to grow on synthetic minimum medium (SMM) containing insoluble phosphate as unique source. Four isolates showed the most active growth and solubilization capability; these isolates were shown to be able to solubilize RP in liquid medium. The study of mechanisms involved in these weathering processes indicated that the isolates produce siderophores. These strains were also shown to possess other PGP properties, these strains were shown to be able to produce the phytohormone, indole acetic acid (IAA) and chitinase. The simultaneous *in vitro* co-culture of *B. cinerea* and actinomycete stop the spread of fungus, stimulate the growth and enhancement of the resistance of grapevine transplants.

This study demonstrated that our selected Actinomycete strains could be used for the development of novel, non-polluting; farming practices by entering in the formulation of novel bio-fertilizer and bio-control products constituted by spores and/or mycelium of the ad hoc Actinobacteria.

Keywords: Endophytics Actinomycetes; gray mould; PGPR activities; grapevine plantlets.

INTRODUCTION

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are bacteria capable of promoting plant growth by colonizing the plant root (Kloepper and Schroth, 1978). PGPR can be divided into two groups according to their relationship with the plants: symbiotic bacteria and free-living rhizobacteria (Khan, 2005). As reviewed by Hallman et al., (1997), Glick (1995, 2001), Sturz et al., (2000), Hall (2002), Lucy et al., (2004), Welbaum et al., (2004) and Compant et al., (2005). These bacteria significantly affect plant growth directly or indirectly, the directly stimulate growth by nitrogen fixation (Han et al., 2005; Meunchang et al., 2006), solubilization of nutrients (Rodriguez and Fraga, 1999), production of growth hormones, 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase (Correa et al., 2004); and indirectly by antagonizing pathogenic fungi by production of siderophores, chitinase, β -1,3-glucanase, antibiotics, fluorescent pigments, and cyanide (Renwick et al., 1999; Pal et al., 2001).

One of the growth-promoting, biotic and abiotic stress resistance bacteria, actinomycetes are of special interest since they possess many properties that could benefit to plant growth or fitness (Noel et al., 2001; Xiao et al., 2002; Hamdali et al., 2008; Leher et al., 2008). Actinomycetes are well-known saprophytic bacteria that decompose organic matter, especially polymers such as lignocellulose, starch, and chitin, in soil. Evidence indicates that actinomycetes are quantitatively and qualitatively important in the rhizosphere (Miller et al., 1990; Sardi et al., 1992), and consequently may influence plant growth and protect plant roots against invasion by pathogenic fungi (Fabre et al., 1988; Whipps, 2001; Tokala et al., 2002; Errakhi et al., 2007). The widely recognized mechanisms of biocontrol mediated by these bacteria are competition for an ecological niche or a substrate by production of siderophores which allow to chelate iron thus depriving iron of other micro-organisms (Cao et al., 2005; Getha et al., 2005), others are fungal parasitic by producing various hydrolytic enzymes (amylase, cellulase, lipase, chitinases etc.) (Yuan and Crawford, 1995; Kham et al., 1997;

Tréjo-Estrada et al., 1998; El-Tarably et al., 2000; Xiao et al., 2002; El-Tarably and Sivasithampar, 2006; Jain and Jain, 2007). Certain species are symbiotic higher plants, these endophytic bacteria form associations called actinorhizes allowing the nitrogen fixing (Davidson, 1988). The *Frankia* genus established a symbiotic association with several phanerogammes. The most known example is the alder (*Alnus*) (Baker, 1988). The actinomycetes, indeed, are known by their capacity to produce antibiotics which enable them to inhibit phytopathogens (Emits and Handelsman, 1999; El-Tarably and Sivasithampar, 2006, Loqman et al. 2009a).

These different abilities were described as scattered in various Actinomycete species but we thought that it might be possible to encounter them in a unique strain. In order to find such strain, we tested the abilities of five antagonistic actinomycetes isolates from the rhizospherical Moroccan soil of *Vitis vinifera*, previously selected for their ability to control the grapevine gray mould (Loqman et al., 2009a) also for their rhizospherical competence and endophytic potential (Loqman et al., 2009b), for their aptitude to excrete substances able to stimulate plant growth (phytohormone, indole acetic acid, IAA). The beneficial effects of these strains on grape vine plantlets growth were assessed in test tubes as well as in soil experiments.

Materials and methods

Plant material and in vitro growth conditions

Plantlets of *Vitis vinifera* L. cv. 'Chardonnay' clone 7535 were micropropagated by nodal explants grown on 15 ml semi-solid medium (Martin et al. 1987), in 25-mm culture tubes under 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ white fluorescent light, 16 h photoperiod at 26°C (Ait Barka et al. 2000). Uniform plantlets (n=24) were selected for each treatment in each experiment.

Actinomycetes strains

Five antagonistic selected actinomycetes strains used in this study were isolated from four Rhizospheric soil of healthy vineyard from 4 different Moroccan fields (Tinjdad, Skoura, Sahara, and Errachidia). Among these, one isolate originate from Sahara (SSh10: *Streptomyces anulatus*) and four from Skoura (SS22: *Streptomyces* sp. FXJ23; SS38: *Streptomyces anulatus*; SS39, SS40: *Micromonospora flavogrisea*). Previously characterized and selected for their ability to control the grapevine gray mould (Loqman et al., 2009a) and for their rhizospherical competence and endophytic potential (Loqman et al., 2009b). Actinomycete spores from the selected strains were stored in 20% sterile glycerol at -20 °C.

In vitro bacterization with Actinomycetes

The bacterial inoculum was produced by transferring tow loops of actinomycetes to 60 mL Bennett liquid medium in a 250 mL Erlenmeyer flask and incubated at 28°C at 150 rpm for 4 days as previously described (Barakate et al., 2002). Bacteria were collected by centrifugation (3 000g; 15 min) and washed twice with phosphate saline buffer (PBS) (pH 6,5). The pellet was resuspended in the same PBS buffer, and then used as inoculum (10^6 CFU/mL). About 1-cm-long nodal explants, taken from 6-week-old plantlets with removed leaves, were dipped in the inoculum for 1 min, blotted with sterile filter paper, and propagated

on Murashige and Skoog medium as above. Nonbacterized controls were dipped only in PBS. The plants were grown in the growth chamber as above.

***Botrytis cinerea* culture**

The *B. cinerea* strain 630 used in this experiment was provided by Dr. Brygoo (INRA, Paris, France). Filamentous fungi were maintained on potato dextrose agar medium (PDA). Fungal inoculum was prepared by growing the fungus for one week on fresh PDA medium. After this period, the *B. cinerea* isolate had developed abundant hyphal swellings. The mycelium was removed aseptically from the PDA plates and was briefly homogenized in a disinfected blender in the presence of sterile distilled water. The density of the fungal inoculum was determined and the concentration of the fungus was adjusted to 10^5 spores/mL.

Artificial inoculation of B. cinerea

Six-week-old bacterized and non bacterized plantlets were inoculated with *B. cinerea*. Inoculation with the pathogen was performed with droplets ($20\mu\text{L}$) of spores suspension (10^5 spores/mL suspended in sterile distilled water) deposited on the second leaf from the top. The development of the disease symptoms was evaluated 5 days after inoculation.

Phosphate solubilization by the selected actinomycetes

Selection of actinomycetes able to use RP as sole phosphate source was carried out on the synthetic minimum medium (SMM) containing 10 g L^{-1} glucose, 2 g L^{-1} NaNO₃, 0.5 g L^{-1} MgSO₄.7H₂O, 0.5 g L^{-1} KCl, 0.01 g L^{-1} FeSO₄.7H₂O and RP^K (0.5 g L^{-1} , containing approximately 2.2 mM phosphorus) as sole phosphate source or on the SMM containing soluble K₂HPO₄ (0.5 g L^{-1} , 4.38 mM) or no phosphate source (according to Hamdali et al., 2008).

In order to estimate the ability of the selected actinomycetes to release soluble phosphate in liquid medium, three culture replicates were inoculated with 10^6 spores/mL of each actinomycetes and grown for 5 days at 28°C on a rotary shaker (180 g min⁻¹) in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of liquid SMM medium with 0.5 g L⁻¹ RP^k. Cultures were centrifuged at 10,000xg for 10 min and the pH of the supernatant was measured every day. The supernatant was analyzed for P₂O₅ content by chlorostannous reduced molybdo-phosphoric acid blue colour method (Olson and Sommers, 1982). Similar measures were carried out in non-inoculated flasks incubated under the same conditions.

Detection of siderophore

In order to determine whether siderophore were present in the culture supernatants of the five selected actinomycete isolates, they were grown for 5 days under the conditions described above. The supernatants were centrifuged at 10, 000 xgmin⁻¹, filtered and concentrated filtrates were deposited on sterile cellulose disks (5 mm diameter) placed aseptically on blue CAS-agar plates as described by Schwyn and Neilands (1987) and incubated at 30 °C for 3 days. Disks impregnated with 2, 4, 6, 8 or 10 µg/mL Desferrioxamine B (Sigma-Aldrich, Germany), a well known siderophore (Tunca et al., 2007), placed aseptically on blue CAS-agar plates and incubated under the same conditions, were used as positive controls. The disks impregnated with solutions containing siderophore were surrounded by a zone of colour change (blue to yellow-orange) of the CAS that was due to iron chelation (Schwyn and Neilands, 1987). The size of the zones and the intensity of the colour change were estimated and compared to the controls.

Assay for chitinase

In order to assay chitinase production by the selected strains, a colloidal chitin suspension was prepared from crab shell chitin as follows: 40 g of chitin were dissolved, under stirring for 30 to 50 min, in 400 mL of HCl 6M (Hsu and Lockwood, 1975). The chitin was precipitated as a colloidal suspension by diluting it slowly with 2 l of deionized water at 5 -10 °C. The colloidal suspension was filtered and washed until the pH of the suspension was about 3.5 and then was dried. Dry chitin (4 g) was added as sole carbon source, in replacement of glucose to 1 L of SMM; containing 0.5 g L⁻¹ RP^K. After autoclaving, the melted agar medium was adjusted to pH 7.8. The positive growth control experiment was made with SMM containing glucose as sole carbon source. Only chitinase excreting isolates could grow on the chitin SMM medium.

Determination of Indol Acetic Acid (IAA) produced

Indoleacetic acid (IAA) production was analysed using a modification of the qualitative method developed by Bric et al. (1991). The growth medium used contained 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 5 g NaCl, 1.02 g L-tryptophane and 20 g agar for 1 litter of deionized water. This medium was sterilized at 121°C for 20 min. Actinomycetes strains were plated on the surface of the medium overlaid with a nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia) and incubated at 28°C for 7 days. After Actinomycetes growth had occurred, the membrane was removed from the plate and treated with Salkowski reagent (2% (w/v) 0.5 M FeCl₃ in 35% perchloric acid) for 15 min at room temperature. Actinomycetes strains producing IAA are identified by a red halo surrounding the colony.

Test for antagonistic activity

The plate diffusion method was used to assess the global anti-microbial activity of the strains (Barakate et al., 2002) against other grapevine Phytopathogenic fungi, *Fomitiporia*

mediterranea, *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora*, the Gram negative bacteria *Escherichia coli* K12 (W1130) and *Pseudomonas aureus* CCMM/B11, the Gram positive bacteria *Micrococcus luteus* ATCC 381, *Bacillus subtilis* ATCC 9524 and *Staphylococcus aureus* DSM 20231 (ATCC 12600), the yeast *Candida albicans* ATCC 2091 and *Rhodotorula rubra* Tü 8093 (strains collection of Microbiology Laboratory, Marrakech). Actinomycete isolates were grown grapevine tissue extract agar medium (Loqman et al., 2009b) for 14 days then three disks (diameter 10 mm) were cut out and placed on 48 h grown lawns of the different microorganisms tested grown on nutrient agar (Difco, USA) for bacteria and yeasts and Sabouraud agar medium (Biorad, France) for fungi. Plates were first stored at 4 °C for at least 2 h to allow the diffusion of any substances produced, then incubated at 28 °C. Sizes of the inhibition zones were determined after 24 h of incubation for bacteria and yeasts and 48 h for fungi. Controls involved the use of sterile agar plugs. Three replicates were performed for each isolate by each microorganism test.

Statistical analyses

The experiment unit in all experiments was an individual plant, contained in test tubes. Plants (24) were evaluated per treatment. An antagonistic test was done using six plates for each treatment. For all experiments, data were analyzed by a t test (least squares means). All experiments were repeated three times.

Results and discussion

Plant rhizosphere is known to be referred ecological niche for various types of soil microorganisms due to riche nutrient availability. It has been assumed that inoculation with Actinomycetes have been shown to promote growth of many plant species. Mashra et al. (1987) tested the culture filtrates of *Micromonospora*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptosporangium* and *Oreskonia* from rhizosphere for plant growth regulatory properties and found these isolates caused dry-weight increases in corn, soybeans, cucumbers, tomatoes and sorghum. In the present investigation five antagonistic selected actinomycetes strains were isolated from four Rhizospheric soil of healthy vineyard from 4 different Moroccan fields (Tinjdad, Skoura, Sahara, and Errachidia). Among these, one isolate originate from Sahara (SSh10: *Streptomyces anulatus*) and four from Skoura (SS22: *Streptomyces* sp. FXJ23; SS38: *Streptomyces anulatus*; SS39, SS40: *Micromonospora flavogrisea*). Previously characterized and selected for their ability to control the grapevine gray mould (Loqman et al., 2009a) and for their rhizospherical competence and endophytic potential (Loqman et al., 2009b). Among the five selected Actinomycetes, we indeed demonstrated that grapevine plantlets co-cultured with SS38, SS39, SS40 and SSh10 strains grow faster and have significantly more secondary roots, roots and leaf hairs (Fig. 1). Shoot and root dry weight was the best indicator of the response of grapevine to inoculation with the five selected Actionmycets. Plant growth was measured and the effect of bacterial inoculation on the plant was assessed (Fig. 1A). The strains that promoted greater plant growth were SS38, SS39, SS40 and SSh10. the shoot and root fresh weights were increased by the treatment with the selected isolates, but the best performing strains were SS38, SSh10 and SS40 that stimulated growth up to 80%, 76% and up to 73% respectively (Table 1). The length of the principal root was boosted when the plantlets were inoculated with SS38 and SSh10, confirming the results obtained by Ait Barka et al. (2000) with grapevine and these obtained by Frommel et al.(1991) with potato plantlets.

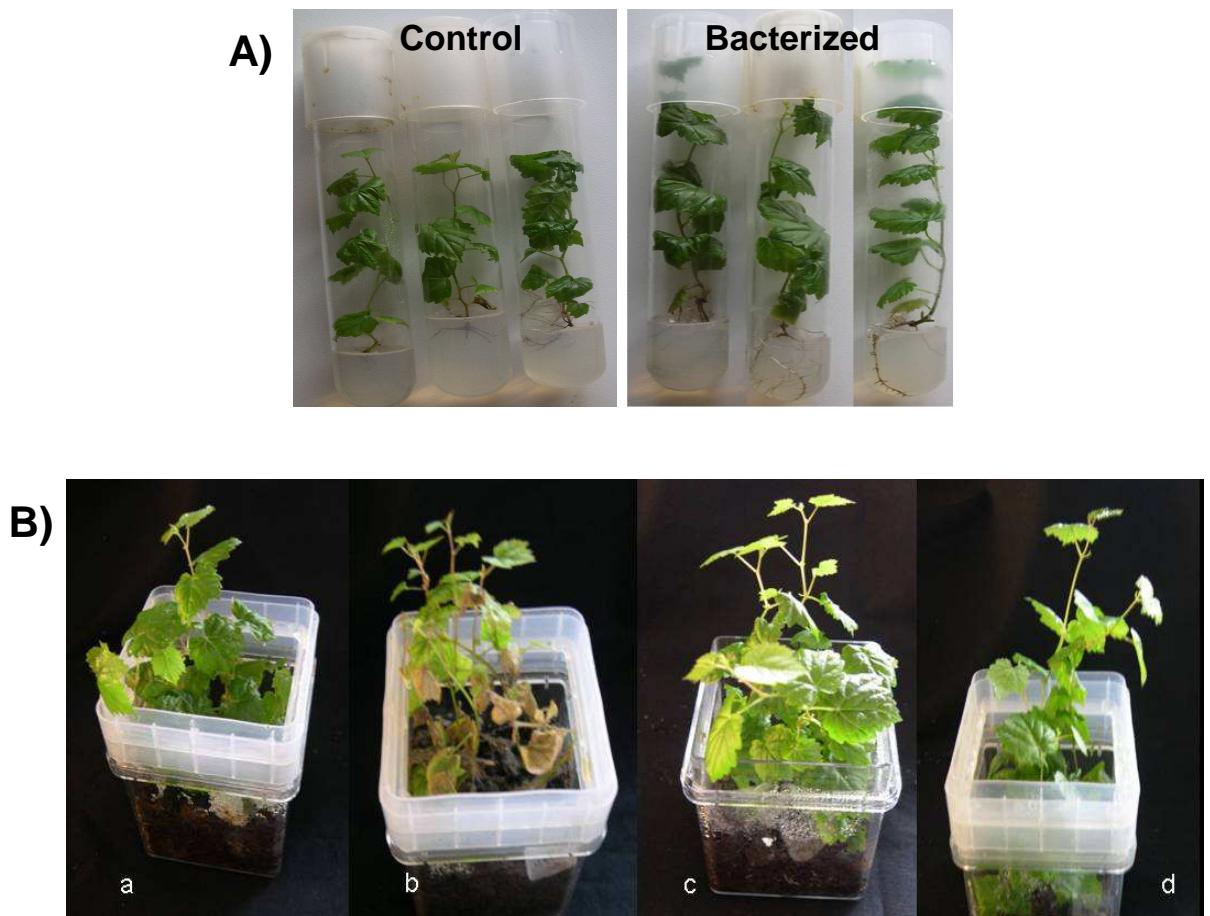


Figure 1: (A) *In vitro* responses of grapevine plantlets co-cultured with *Streptomyces anulatus*-related strain (SS38); (B-a) nonbacterized plantlets; (B-b) nonbacterized plantlets + *B. cinerea*; (B-c) Bacterized plantlets; (B-d) bacterized plantlets + *B. cinerea*.

Table 1: influence of the five Actinomycete isolates on *in vitro* growth parameters of *V. Vinifera L.*

Treatments	NN	SFW(g)	RFW(g)	TB(g)
Control	13±0.54	0.69±0.03	0.38±0.05	1.07±0.07
SS22	14±0.32	0.72±0.02	0.44±0.02	1.14±0.05
SS38	19±0.22	1.28±0.02	0.69±0.03	1.87±0.03
SS39	16±0.47	1.02±0.02	0.58±0.04	1.60±0.04
SS40	18±0.86	1.17±0.03	0.65±0.03	1.80±0.07
SSh10	17±0.28	1.18±0.05	0.68±0.02	1.83±0.05

NN, node number; SFW, shoot fresh weight; RFW, root fresh weight; TB, total biomass.
Values per plantlets are means of 24 replicates based on 12-week-old-plantlets.

Enhancement of plant growth following inoculation with plant growth promoters can result from wide varieties of direct and indirect activities (Glick, 1995). It could be the direct action of the introduced isolates in making available soil nutrients for plant growth or by the production of plant growth regulators in planta or in the rhizosphere by the introduced microorganisms. Indirect effects are those related to the production of metabolites, such as antibiotics which increase plant growth by decreasing the activities of pathogens or deleterious microorganisms (Glick, 1995). Plant growth enhancement resulting from increased availability of nutriments was evident in our present work where a rock phosphate-solubilizing. The five selected actinomycete strains showed different abilities to release soluble phosphate from RP (Fig. 2). Phosphate release ranged from 9,93 to 25,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The phosphate solubilization was most frequently encountered by SS38, SS40, SSh10 and SS39 respectively in comparison to control whereas the weak phosphate concentration was observed in the presence of S22 with 9, 93 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 2). The different aptitudes for the solubilization of RP might reflect different modes of solubilization. Reports in the literature suggest that microbial solubilization of mineral phosphate might be either due to excretion of organic acids causing acidification of the external medium (Whitelaw, 2000) or to the excretion of chelating substances (such as siderophores) that form stable complexes with phosphorus absorbents (aluminium, iron and calcium) (Watteau and Brethelin, 1994; Welch et al., 2002, Hamdali et al., 2008) and thus increase phosphate solubilization. No acidification of the growth medium was observed for any of strains; suggesting that our most effective RP solubilizing strains do not excrete organic acids but excrete chelator substances as revealed by the blue CAS-agar test (Schwyn and Neilands, 1987). Siderophore production was detected among the five selected Actinomycetes with the SS38, SS40, SS39 and the SSh10 strains were the most efficient producers of the siderophores as judged by the size of the zone and the

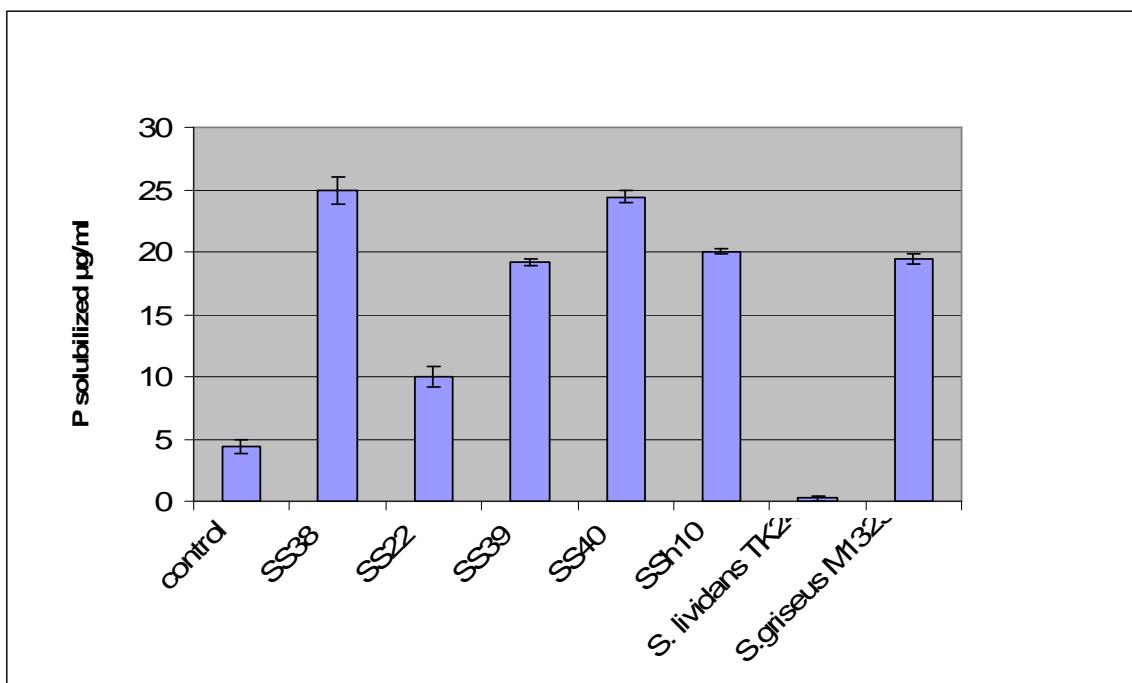


Figure 2: Concentration of soluble phosphate released from rock phosphate in the supernatant of cultures of the 5 selected isolates grown for five days in SMM containing $0.5 \text{ g l}^{-1} \text{ RP}^K$ and in the medium of the non-inoculated flasks incubated in the same conditions (control).

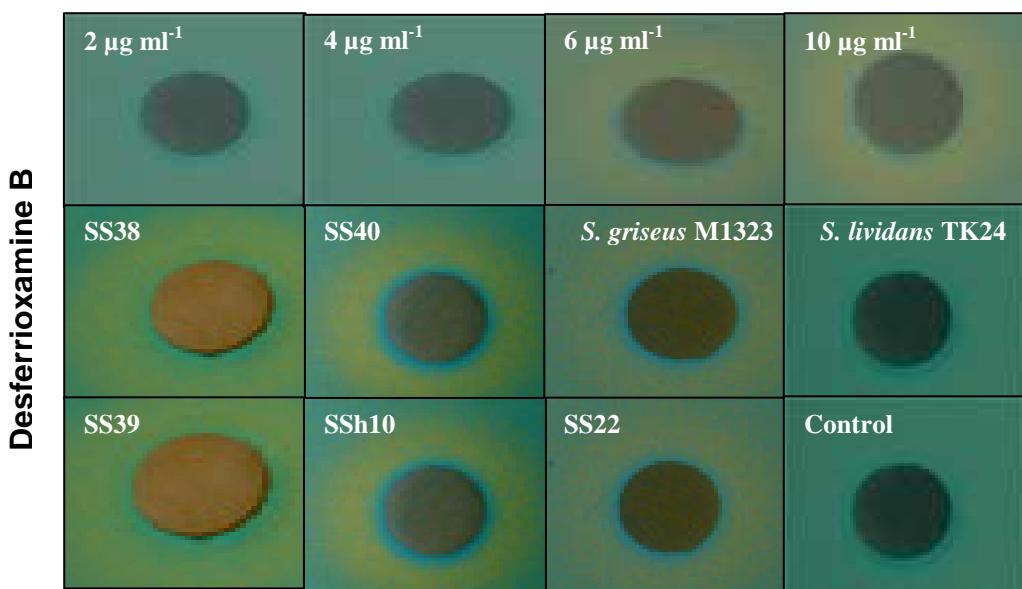


Figure 3: Cellulose disks impregnated with $20 \mu\text{l}$ of solution of Desferrioxamine B at different concentration or with $20 \mu\text{l}$ of eight fold concentrated culture supernatants of cultures of the 5 selected isolates and of the control grown for 5 days in liquid SMM containing $0.5 \text{ g l}^{-1} \text{ RP}^K$ and deposited on the surface of a CAS-blue agar plate.

intensity of the colour change of the CAS-agar (Fig. 3) whereas the strain SS22 excreted very little, if any, of these substance with *S. lividans* TK24 (negative control).

Another important element of plant fitness is its ability to resist of various plant pathogens such as phytopatogenic fungi (Whipps, 2001). The plant possesses its own mechanisms of resistance (Franceschi et al., 2005) but the micro-organisms of the soil could contribute to this fight by excreting substances limiting growth of the phytopathogenic fungi (Vassilev et al., 2006; Jain and Jain, 2007) or stimulating natural defences of the plant (Prévost et al., 2006; Lehr et al., 2008). In the present study, four out of the five antagonistic selected Actinomycete isolates, *Streptomyces anulatus*-related strain (SS38 and SSh10), *Micromonospora flavogrisea*-related strain (SS40) and *Streptomyces* sp. FXJ23-related strain (SS22), were shown to be efficiency to limit growth, at least on Petri dishes, of three grapevine phytopatogenic fungi. The confirmation of this protective effect in soil was evaluated with *B. cinerea* (Fig. 1B). As reported by other studies, this protective effect might be increased by the ability of the selected actinomycete strains to excrete chitinase (Taechowisan et al., 2004), IAA (Noel et al., 2001), siderophores (Matthijs et al., 2007; Hamdali et al., 2008) or to other anti-fungal substances (Table 2) that remain to be characterized.

This study demonstrated that the selected Actinomycete strains have multifunctional PGP properties as do other soil born micro-organisms such as *Pseudomonas* sp. strain PsJN (Ait Barka et al. 2002; Compant et al., 2005), *Pseudomonas putida* (Pandy et al., 2006), *Acinetobacter* sp. PSGB03 and *Serratia* sp. PRGB11 (Indiragandhi et al., 2008) that were able to solubilise insoluble phosphate as well to produce IAA, chitinase, β -1,3-glucanase, siderophores and antifungal substances to improve plant growth. However, to our knowledge, it is the first report mentioned the ability of the Actinomycete strains to promote growth and to limit phytopatogenics attack on grapevine plantlet.

Table 2: Antimicrobial activities of five Actinomycete isolates on selected media at 28 °C (n=3).

Isolates			SS38	SS22	SS39	SS40	SSh10
Origin			Skoura				Sahara
Activity against *	Fungi	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	++	++	-	+++	+++
		<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	++	++	-	+++	+++
		<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	+++	++	++	+++	+++
	Gram+ bacteria	<i>Micrococcus luteus</i>	+++	+++	+++	++	++
		<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++	+++	+	+
		<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	++	++	++
		<i>Escherichia coli</i>	+	++	++	+	++
	Gram- bacteria	<i>Pseudomonas aureus</i>	++	++	++	++	++
		<i>Candidas albicans</i>	+	+	-	++	++
	Yeast	<i>Rhodotorula rubra</i>	+	+	+	++	++
Other activities ***		Siderophores	1	1	1	1	1
		Chitinases	1	1	1	1	1
		IAA	1	1	1	0	1

References

- Ait barka, E., Belarbi, A., Hachet, C., Nowark, J., Audran, J.C., 2000. Enhancement of *In vitro* growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera L.* co-cultured with plant growth -promoting rhizobacteria. FEMS Microbiol. Lett. 186,91-95.
- Ait Barka, E., Gognies, S., Nowak, J., Audran, J.C., Belarbi, A., 2002. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. Biol. Control 24,135-142.
- Baker, D.D., 1988. Opportunities for autoecological studies of Frankia, a symbiotic actinomycete. In "Biology of Actinomycetes '88" Okami Y., Beppu T. & Ogawara H., Tokyo: Japan Scientific Societies Press Ed., pp: 271-276.
- Barakate, M., Ouhdouch, Y., Oufdou, K.H., Beaulieu, C., 2002. Characterization of rhizospheric soil Streptomyces from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. World J. Microbiol. Biotechnol. 18, 49-54.
- Becker, B., Lechevalier, M.P., Gordon, H.A., Lechevalier, H.A., 1964. Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. Appl. Microbiol. 12, 421-423.
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H., Zhou, S., 2005. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of Fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. FEMS Microbiol. Lett. 247,147-152.
- Compart, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Ait Barka, E., 2005. Biocontrol of plant diseases using plant growth-promoting bacteria (PGPB): principles, mechanisms of action and future prospects. Appl. Environ. Microbiol. 71,4951-4959.
- De Freitas, J.R., Banerjee, M.R., Germida, J.J., 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus L.*). Biol. Fertil. Soils 24, 358-364.

- El-Tarably, K.A., Sivasithamparam, K., 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol. Biochem.* 38,1505-1520.
- El-Tarably, K.A., Soliman, M.H., Nassar, A.H., Al-Hassani, H.A., Sivasithamparam, K., McKenna, F., Hardy, G.E. St. J., 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathology.* 49,573–583.
- Errakhi, R., Bouteau, F., Lebrihi, A., Barakate, M., 2007. Evidences of biological control capacities of Streptomyces spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23,1503-1509
- Fabre, B., Armau, E., Etienne, G., Legendre, F., Tiraby, G., 1988. A simple screening method for insecticidal substances from Actinomycetes. *J. Antibiot. (Tokyo)* 41, 212-219.
- Franceschi, V.R., Krokene, P., Christiansen, E., Krekling, T., 2005. Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New. Phytol.* 167,353-375.
- Frommel, M.I., Nowak, J. and Lazarovits, G., 1991. Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grow potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol.* 96, 928-936.
- Getha, K., Vikineswary, S., 2002. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *J. Ind. Microbiol.* 28,303-310.
- Goldstein, A.H., 1994. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. In: Torriani-Gorini A., Yagil E., Silver, S. (Eds.), *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology*. ASM Press, Washington D.C., pp. 197-203.
- Gyaneshwar, P., Kumar, G.N., Parekh, L.J., Poole, P.S., 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil* 245, 83-93.

- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. and Kloepfer, J.W., 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43, 895-914.
- Hamdali, H., Bouizgarne, B., Hafidi, M., Lebrihi, A., Virolle, M.V., Ouhdouch, Y., 2008. Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Appl. Soil. Ecol.* 38,12-19.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., Schrempf, H., 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
- Hopwood, D.A., Kieser, T., Wright, H.M., Bibb, M.J., 1983. Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66. *J. Gen. Microbiol.* 129, 2257-2269.
- Ikeda, T., 2003. Pharmacological effects of ivermectin, an antiparasitic agent for intestinal strongyloidiasis: its mode of action and clinical efficacy. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 122, 527-538.
- Jain, P.K., Jain, P.C., 2007. Isolation, characterization and antifungal activity of *Streptomyces sampsonii* GS 1322. *Indian J. Exp. Biol.* 45, 203-206.
- Jiang, Y., Li, W.J., Xu, P., Tang, S.K., Xu, L.H., 2005. Study on diversity of Actinomycetes salt and alkaline environments. *Wei Sheng Wu Xue Bae* 46, 191-195.
- Khan, M.S., Zaidi, A., 2007. Synergistic effects of the inoculation with plant growth promoting rhizobacteria and an arbuscular mycorrhizal fungus on the performance of wheat. *Turk. J. Agric. For.* 31, 355-362.
- Khan, N.I., Filonow, A.B., Singleton, L.L., 1997. Augmentation of soil with sporangia of Actinoplanes spp. for biological control of Pythium damping-off. *Biocontrol Science and Technology* 7, 11-22.
- Lehr, N.A., Schrey, S.D., Hampp, R., Tarkka, M.T., 2008. Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against

phytopathogens in Norway spruce. New Phytol. DOI 10.1111/j.1469-8137.2007.02322.x.

Liu, D., Coloe, S., Baird, R., Pedersen, J., 2000. Rapid Mini-Preparation of Fungal DNA for PCR. *J. Clin. Microbiol.* 471-471.

Loqman, S., Ait Barka, E., Clément, C., Ouhdouch, Y., 2009. Antagonistic actinomycetes from Moroccan saoil to control grapevine gray mold. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 81-91.

Loqman, S., Ait Barka, E., Clément, C., Ouhdouch, Y., 2009b. Antagonistic actinomycetes from Moroccan saoil to control grapevine gray mold. *World J. Microbiol. Biotechnol.* Soumis Biological control.

Macias, F.A., Marin, D., Oliveros-Bastidas, A., Varela, R.M., Simonet, A.M., Carrera, C., Molinillo, J.M.G., 2003. Allelopathy as a new strategy for sustainable ecosystems development. *Biological Science in Space*, 18-23.

Manulis, S., Shafrir, H., Epstein, E., Lichter, A., Barash, I., 1994. Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces spp.* *Microbiol.* 140, 1045-1050.

Matthijs, S., Tehrani, K.A., Laus, G., Jackson, R.W., Cooper, R.M., Cornelis, P., 2007. Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-*Pythium* activity. *Environ. Microbiol.* 9,425-434.

Martin, C., Vernoy, R., Carré, M., Vesselle, G., Collas, A., Bougerey, C., 1987. The vine and techniques of *in vitro* cultivation. *Bull. Org. Int. Vigne* 675-676,447-458.

Meunchang, S., Panichsakpatana, S., Weaver, R.W., 2006. Tomato growth in soil amended with sugar mill by-products compost. *Plant Soil* 280, 171–176.

- Noel, G.M.A.M., Madrid, E.A., Bottini, R., Lamattina, L., 2001. Indole acetic acid attenuates disease severity in potato-*Phytophthora infestans* interaction and inhibits the pathogen growth *in vitro*. Plant Physiol. Biochem. 39,815-823.
- Olsen, S.R., Sommers, L.E., 1982. Phosphorus. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeny, D.R. (Eds.), Methods of Soil Analysis, Part 2. American Society of Agronomy, Madison, pp. 403-430.
- Ouhdouch, Y., Barakate, M., Finance, C., 2001. Actinomycetes of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. Eur. J. Soil Biol. 37, 69–74.
- Pal, K.K., Tilak, V.B.P., Saxena, A.K., Dey, R., Singh, C.S., 2001. Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiol. Res. 156, 209–223.
- Prévost, K., Couture, G., Shipley, B., Brzezinski, R., Beaulieu, C., 2006. Effect of chitosan and a biocontrol streptomycete on field and potato tuber bacterial communities. Biocontrol 51,533-546.
- Pathom-Aree, W., Stach, J.E., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T., Goodfellow, M., 2006. Diversity of Actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. Extremophiles 10, 181-189.
- Pikovskaya, R.I., 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya 17, 362–370.
- Reyes, I., Valery, A., Valduz, Z., 2006. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. Plant Soil 287, 69-75.
- Rodriguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnol. Adv. 17, 319-339.

- Rudresh, D.L., Shivaprakash, M.K., Prasad, R.D., 2005. Tricalcium phosphate solubilizing abilities of *Trichoderma* sp. In relation of P uptake and growth and yield parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Can. J. Microbiol. 51, 217-222.
- Sardi, P., Saracchi, M., Quaroni, S., Petrolini, B., Borgonovi, G.E. and Merli, S., 1992. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2691-2693.
- Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochem. 160, 47-56.
- Shigaki, F., Sharpley, A.N., Prochnow, L.I., 2006. Animal-based agriculture, phosphorus and management and water quality in Brazil: options for the future. Sci. Agric. 63, 194-209.
- Shirling, E.B., Gottlieb, D., 1966. Methods for characterization of *Streptomyces species*. Int. J. Syst. Bacteriol. 16, 313-340.
- Sturz, A.V. and Nowak, J., 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. Appl. Soil Ecol. 15, 183-190.
- Taechowisan, T., Peberdy, J.F., Lumyong ,S. 2004. PCR cloning and heterologous expression of chitinase gene of endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130. J. Gen. Appl. Microbiol. 50, 177-182.
- Tokala, R.P., Strap, J.L., Jung, M.C., Crawford, D.L., Salove, M.H., Deobald, L.A., Bailey, F.J., Morra, M.J., 2002. Novel plant microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces Lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). Appl. Environ. Microbiol. 68, 2161-2171.
- Tunca, S., Barreiro, C., Sola-Landa, A., Coque, J.J., Martin, J.F., 2007. Transcriptional regulation of the desferrioxamine gene cluster of *Streptomyces coelicolor* is mediated by binding of DmdR1 to an iron box in the promoter of the desA gene. FEBS J. 274, 1110-1122.

- Vassilev, N., Vassileva, M., Nikolaeva, I., 2006. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 137-144.
- Watteau, F., Berthelin, J., 1994. Microbial dissolution of iron and aluminium from soil minerals: efficiency and specificity of hydroxamate siderophores compared to aliphatic acids. *Eur. J. Soil Biol.* 30, 1-9.
- Welbaum, G., Sturz, AV., Dong, Z. and Nowak, J., 2004. Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. *Crit. Rev. Plant Sci.* 23, 175-193.
- Welch, S.A., Taunton, A.E., Banfield, J.F., 2002. Effect of microorganisms and microbial metabolites on apatite dissolution. *Geomicrobiol. J.* 19, 343-367.
- Whipps, J.M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52 487-511.
- Whitelaw, M.A., 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Advan. Agron.* 69, 99-144
- Yuan, W.M., Crawford, D.L., 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC1 08 as potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3119-3125.
- Zapata, F., Zaharah, A.R., 2002. Phosphorus availability from phosphate rock and sewage sludge as influenced by the addition of water-soluble phosphate fertilizer. *Nut. Cyc. Agroecosys.* 63, 43-48.
- Zhao, X., Lin, Q., Li, B., 2002. The solubilization of four insoluble phosphates by some microorganisms. *Wei Sheg Wu Xue Bao* 42, 236-41.

CHAPITRE III

Identification des isolats actinomycétales antagonistes sélectionnés

La taxonomie des actinomycètes a connu une évolution importante en fonction du développement des connaissances. Ce groupe de microorganisme procaryotes appartient à l'ordre des Actinomycétales créé par Buchaman en 1917. La classification des espèces dans cet ordre est faite selon des critères morphologiques et chimiques. Cependant avec la prolifération des espèces, il s'est avéré que ces méthodes sont insuffisantes et non concluantes pour la distinction d'organismes proches ou pour la détermination d'un groupement rationnel des genres au sein du groupe. En effet, malgré l'efficacité de ce type de classification, l'adoption des caractéristiques génétiques est devenue essentielle pour l'étude de la biodiversité bactérienne et la caractérisation définitive des microorganismes.

L'objectif de ce chapitre est l'identification par les moyens chimiques, physiologiques et moléculaires des actinomycètes les plus efficaces sélectionnés pour leur capacité endophytique, PGPR et antagonistes vis-à-vis des champignons phytopatogènes de la vigne.

La classification des souches a été effectuée selon deux étapes, une étape numérique portant sur les caractéristiques morphologiques et l'analyse chimique des parois cellulaires des actinomycètes. La deuxième est basée sur les caractéristiques moléculaires des souches antagonistes.

Les caractéristiques morphologiques et culturelles des antagonistes ont été étudiées par l'utilisation des milieux ISP (International *Streptomyces* Project) (Pridham et Gottlieb, 1948 ; Shirling et Gottlieb, 1966). L'analyse chimique des parois cellulaires a porté sur le dosage des acides aminés selon la méthode décrite par Becker et al. (1964) et des sucres selon la méthode décrite par Lechevalier et Lechevalier, 1980. Les résultats ont montré que les souches contiennent L-DAP et la glycine. D'autre part, l'observation sous microscope électronique à balayage a montré que les souches forment des chaînes de spores en spirale ou dégradées. L'ensemble de ces données indique que les souches antagonistes étudiées appartiennent au genre *Streptomyces*.

Par la suite, nous avons procédé à l'identification moléculaire des souches antagonistes. L'extraction de l'ADN de chaque souche a été effectuée séparément selon la méthode de Hopwood (1985). L'ADN est obtenu en cultivant, à 30°C pendant 5 jours, les isolats d'actinomycètes dans 100 ml de milieu ISP2 agité (en Erlenmeyer). La culture est centrifugée et le mycélium, lavé deux fois à l'eau bidistillée puis récupéré. Dans un tube

Eppendorf stérile de 1,5 ml contenant 500 ml de tampon de lyse (400 mM de Tris-HCl [pH 8.0], 60 mM d'EDTA [pH 8,0], 150 mM de NaCl, 1% de sodium dodecyl sulfate), une petite quantité de mycélium est ajoutée et dispersée à l'aide d'une spatule stérile. Le tube est laissé pendant 10 min à température ambiante. Après addition de 150 ml d'acétate de potassium (pH 4,8 ; qui est composé de 60 ml d'acétate de potassium 5 M, 11,5 ml d'acide acétique glacial, et 28,5 ml d'eau distillée), le tube est vortexé brièvement et centrifugé à 10 000 g pendant 1 min. le surnageant est transvasé dans un autre tube Eppendorf et centrifugé comme précédemment. Après transfert du surnageant dans un nouveau tube Eppendorf, un volume égal d'isopropanol est ajouté. Le tube est brièvement mixé par inversion puis, centrifugé à 10 000 g pendant 2 min, puis le surnageant éliminé. L'ADN obtenu sous forme de pellettes est lavé avec 300 ml d'éthanol à 70%, centrifugé à 10 000 rpm pendant 1 min. le surnageant est éliminé et l'ADN séché à l'air puis dissout dans 50 µl d'eau bidistillée stérile.

L'amplification de la partie ADNr 16s a été effectuée en utilisant deux amorces universels 27f (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492r (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'). L'ADN est amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction) avec kit Invitrogen. L'amplification est réalisée dans un "Touchgene (Techne) thermal cycler" selon le profil suivant :

- Une étape initiale de dénaturation à 98°C pendant 3 min, suivie de l'addition de Taq polymerase.
- 35 cycle d'amplification à 94°C pendant 1min, 52°C pendant 1 min, 72°C pendant 2 min et,
- Une étape finale d'extension à 72°C pendant 10 min.

Le produit PCR est détecté par électrophorèse sur gel d'agarose contenant du Bromure d'éthydium et visualisé par fluorescence UV.

Le séquençage est effectué par GenomExpress. Les amorces sont les mêmes que celles utilisées lors de la PCR. Une fois la séquence déterminée, elle est comparée à celles des espèces référence disponibles dans des banques génomiques de données et utilisant le "NCBI Blast" disponible sur internet au niveau du site Web : ncbi-nlm-nih.gov

.

Les résultats du séquençage ont montré que :

- ❖ La souche SS10 présente un pourcentage de similarité de 99% avec *Streptomyces marokkonensis* nouvelle espèce identifiée récemment par notre laboratoire.

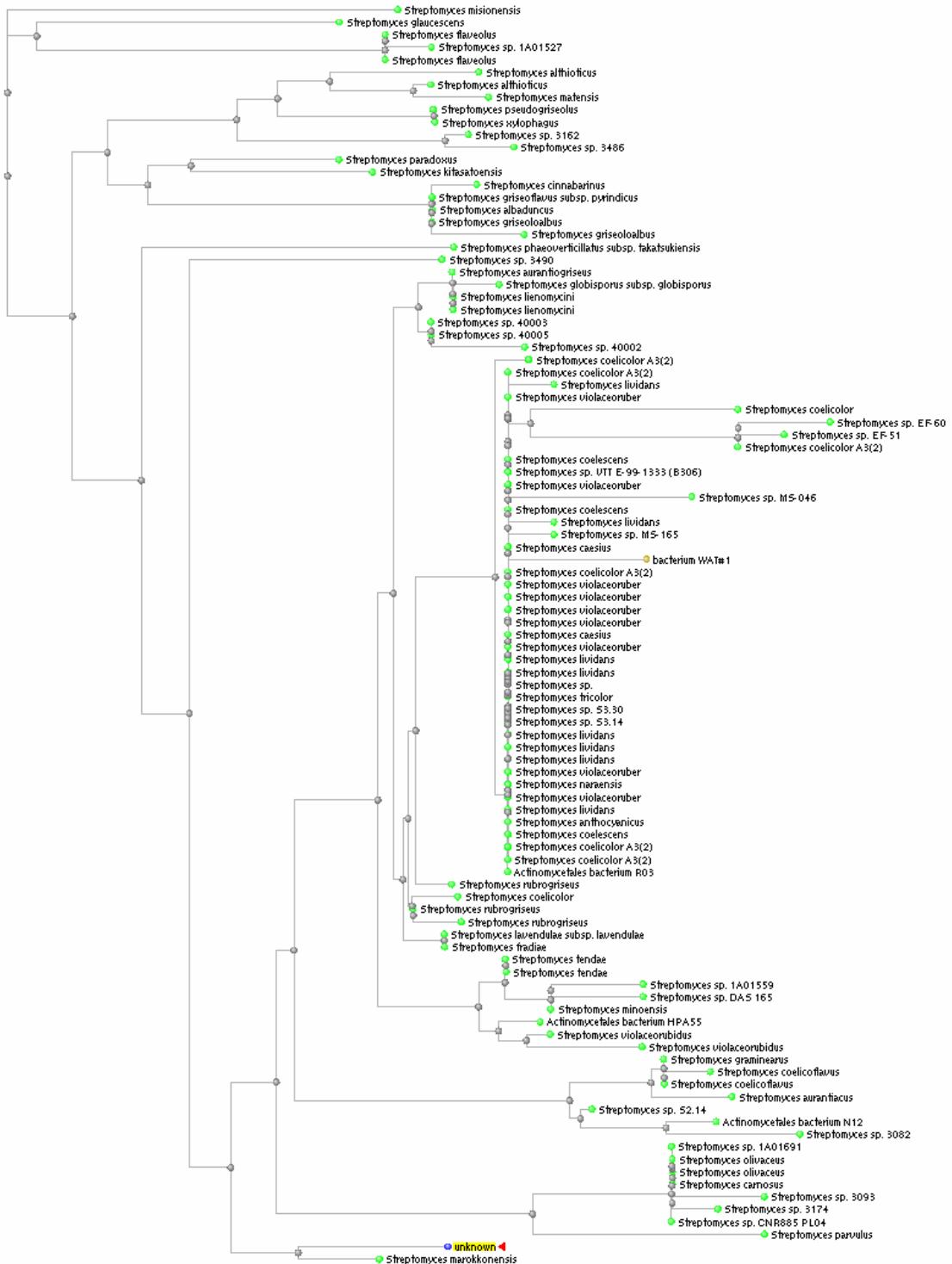


Figure 1 : Arbre phylogénétique montre le % d'identité de la souche SS10 avec la séquence de l'ADN 16S des espèces les plus proches.

❖ la souche SS38 présente un pourcentage de similarité de 99% avec *Streptomyces purpurascens* :



Figure 2 : Arbre phylogénétique montre le % d'identité de la souche SS38 avec la séquence de l'ADN 16S des espèces les plus proches.

- ❖ la souche SS40 présente un pourcentage de similarité de 99% avec *Streptomyces* sp. B22 :

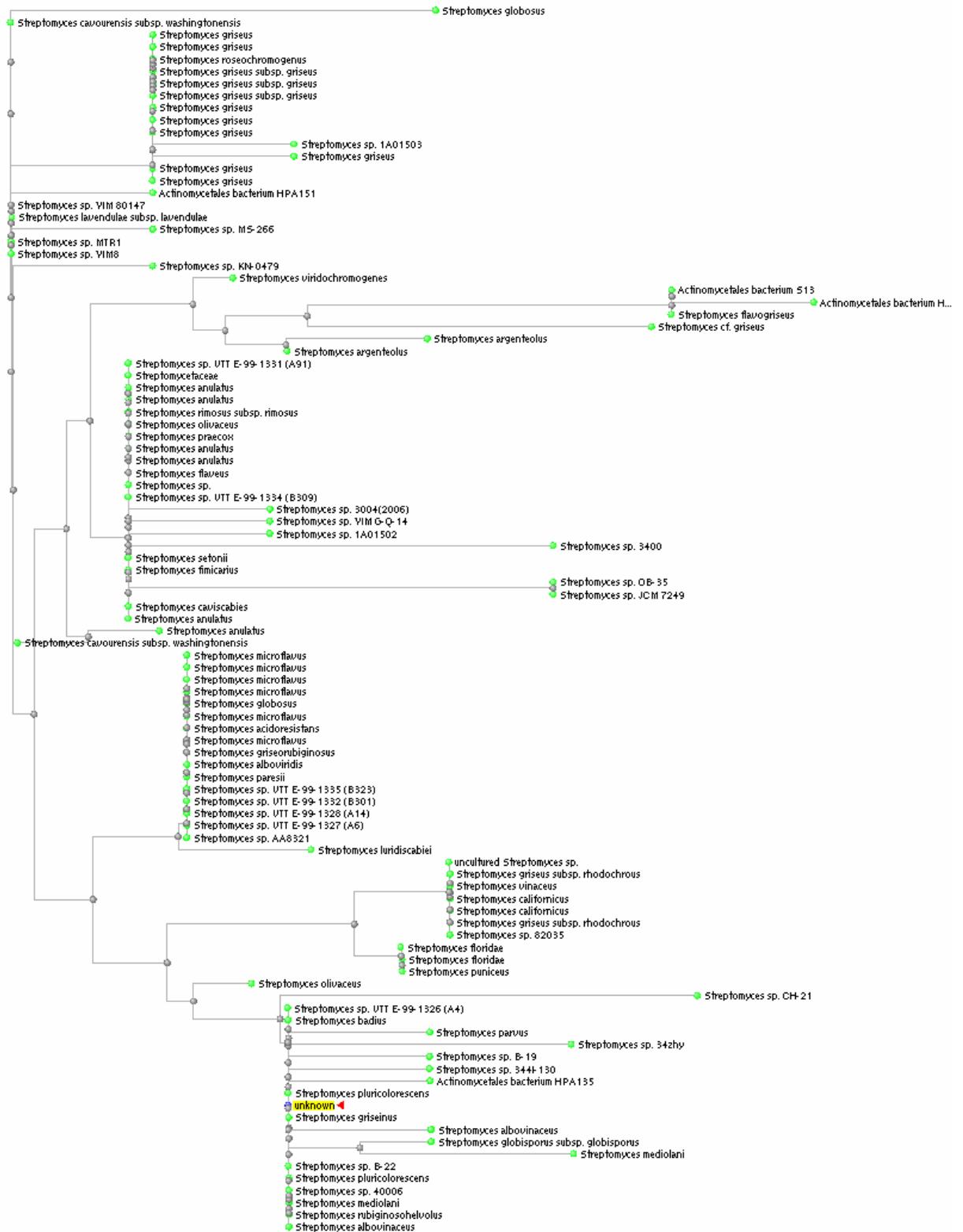


Figure 3 : Arbre phylogénétique montre le % d'identité de la souche SS40 avec la séquence de l'ADN 16S des espèces les plus proches.

En se basant sur l'analyse des trois arbres phylogénétiques, on a constaté que ces trois souches forme chacune une branche séparée. Ainsi, la comparaison des caractères morphologiques et biochimiques de ces trois souches avec ceux de leur souches similaires nous a permis de relever des différences remarquables, d'où l'idée qu'il s'agit de nouvelles espèces.

Des études plus poussées par la technique d'Hybridation ADN-ADN, ont montré que trois souches antagonistes SS38, SS40 et SS10 correspondent bien à de nouvelles espèces du genre *Streptomyces*.

Pour des raisons de confidentialités (voir annexe), on va présenter les résultats de la souche SS10 comme modèle pour ce chapitre d'identification.

Publication 4:

***Streptomyces thinghirensis* sp. nov., a novel bacterium isolated from rhizosphere soil of *Vitis vinifera*.**

Auteurs : Loqman S.^{1, 2}, Bouizgarne B.³, Ait Barka E.², Clément C.², von Jan M.⁴, Spröer C.⁴, Klenk H.-P⁴ and Ouhdouch Y^{1*}

Journal: à *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (Accepted 2009).

***Streptomyces thinghirensis* sp. nov., a novel bacterium isolated from rhizosphere soil of *Vitis vinifera*.**

Loqman S.^{1,2}, Bouizgarne B.³, Ait Barka E.², Clément C.², von Jan M.⁴, Spröer C.⁴, Klenk H.-P⁴ and Ouhdouch Y^{1,*}.

¹Laboratoire de Biologie et Biotechnologie des Microorganismes, Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, B.P S-2390, Marrakech, Morocco.

²Laboratoire de Stress Défense et Reproduction des Plantes B.P 1039-51687 Reims France.

³Equipe de lutte intégrée, Laboratoire de Biotechnologie végétale et valorisation des ressources naturelles Faculté Sciences Agadir, Morocco

⁴DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Inhoffenstraße 7B, 38124, Braunschweig, Germany

*Author for correspondence: E-mail: ouhdouch@ucam.ac.ma

Short title: *Streptomyces thinghirensis* sp. nov.

Subject category: New Taxa (Gram-positive Bacteria)

The 16S rRNA gene sequence of strain DSM 41919^T has been deposited in GenBank under the accession number FM202482

A novel actinomycete, strain S10^T, was isolated from wild *Vitis vinifera* rhizosphere soil in Thinghir, Ouarzazate Province, Southern Morocco. The taxonomic status of this strain was established using a polyphasic approach. Strain S10^T has white-grey aerial mycelium with long, spiral spore chains bearing smooth surfaced spores and produces a yellow diffusible pigment. Chemotaxonomy shows that the cell wall of strain S10^T contains LL-diaminopimelic acid and glycine. Phylogenetic analysis based on the almost complete 16S rRNA gene sequence indicated that strain S10^T belongs to the Group I streptomycetes, branching off next to *S. marokkonensis* DSM 41918^T from the *Streptomyces violaceoruber* group. DNA-DNA relatedness and phenotypic data distinguished strain S10^T from the phylogenetically closest related type strains. It is therefore proposed that strain S10^T (CCMM b35^T = DSM 41919^T) represents the type strain of a novel *Streptomyces* species, for which the species name *Streptomyces thinghirensis* is proposed.

Over the past decades, interest in discovering new sources of secondary metabolites with applications, such as medicine (Newman *et al.*, 2003) or agriculture (Copping & Menn, 2000), has significantly increased. Microorganisms are an almost unlimited source of novel compounds. Among them, actinomycetes hold a prominent position due to their ability to produce various secondary metabolites including antibiotics (Lazzarini *et al.*, 2000; Watve *et al.*, 2001; Donadio *et al.*, 2002), antitumor agents (Maskey *et al.*, 2003) and enzymes (Breccia *et al.*, 1995; Ko *et al.*, 2005). Actinomycetes are Gram positive, aerobic bacteria. They form branching substrate and aerial mycelia that bear spores and possess DNA with a usually high G+C content. Many species of the genus *Streptomyces* are known to produce antibiotics (Chun *et al.*, 1997; Labeda *et al.*, 1997). Actinomycetes represent a high proportion of soil microbial biomass, and appear to be of importance among the microbial flora of the rhizosphere (Sardi *et al.* 1992). Associations between actinomycetes and plant organs can be deleterious or beneficial for the host. While some actinomycetes secrete herbicidal compounds (Tanaka & Omura 1993) or cause plant diseases (Locci, 1994), others can symbiotically fix atmospheric nitrogen (Oakley *et al.* 2004) or protect plants against fungal infections (Cao *et al.* 2005). Several descriptive reports have shown that actinomycetes are a promising group of fungus-antagonistic and root-colonizing microbes. They protect to various degrees several different plants from soil-borne fungal pathogens (El-Tarably & Sivasithamparam 2006).

In the course of our screening program for actinomycetes active against many phytopathogens from Moroccan habitats (Loqman *et al.*, 2009), one actinomycete strain, strain S10^T, was isolated from wild healthy *Vitis vinifera* rhizosphere soil, collected from Thinghir, in Ouarzazate Province, Southern Morocco, identified using a polyphasic approach. Results show that strain S10^T can be classified as a new species within the genus *Streptomyces*. Strain S10^T was isolated on soil extracts agar as described in Ouhdouch *et al.* (2001). The strain was

maintained on the International *Streptomyces* Project N°2 (ISP2) agar slants (glucose -yeast extract -malt extract agar) at 4°C as 20% glycerol stocks at -20°C but also deposited in public strain collections. Biomass for chemical and molecular studies was obtained by growing S10^T in shake flasks in ISP 2 broth (28°C, one week, 150 rpm).

Physiological characteristics were determined after 2 weeks growth at 28°C as per the methods prescribed in the (ISP) (Shirling & Gottlieb, 1966). Morphological properties were examined by light microscopy (Olympus microscope) and Scanning Electronic Microscope (Type JEOL). The colour of the aerial mycelium was determined from mature sporulating aerial mycelia according to the scale adopted by Prauser (1964) and the colour series was determined according to the system proposed by Nonomura (1974). Production of melanoid pigments was determined on ISP6 and ISP7 media. Analysis of cell wall diaminopimelic acid isomers and whole cell sugars was performed according to the protocol described by Lechevalier & Lechevalier (1980). Fatty acid methyl-esters and mycolic acid trimethyl-silylesters were prepared and analyzed as previously described (Klatte et al., 1994) using the standard Microbial Identification System (MIDI Inc. Delaware) for automated gas chromatographic analyses (Sasser, 1990).

Carbon source utilization was determined on ISP9 medium supplemented with sterile carbon sources. Standard techniques were used for the determination of catalase, oxidase and nitrate reduction activity. Sensitivity to NaCl was established by the method of Tresner et al. (1968). Growth temperature range was determined on ISP2 and Bennett medium (Jones, 1949). Antibiotic resistance was examined by the disc diffusion method on Olson's medium (Olson, 1968) incubated at 28 °C for 21 hours. The antimicrobial activity of the strain S10T was determined by the plate diffusion method (Bauer et al., 1966). Bacterial test strains were incubated on nutrient agar at 37°C for 24 hours and fungal strains were incubated on Sabouraud agar medium at 28°C for 24 hours for yeasts and 48 hours for moulds.

For the 16S rRNA gene sequence analysis, strain S10^T was cultivated for two days at 28°C with agitation in 500 ml flasks containing 100 ml of Hickey-Tresner medium, 1 g l⁻¹ yeast extract, 1 g l⁻¹ beef extract, 2 g l⁻¹ NZamine A, 10 g l⁻¹ Dextrin, 20 mg l⁻¹ CoCl₂.6H₂O (Hopwood *et al.*, 1985). Biomass was harvested by centrifugation (8000 g for 10 min) and washed twice with double-distilled water. Mycelia (200 mg) were used for DNA extraction as described in Liu *et al.* (2000). The 16S rDNA was amplified by PCR using the universal primers PA and PH. Amplification was carried out in 50 µl reaction volumes containing 1.5U of AmpliTaq Gold *Taq* polymerase (Applied Biosystems), dNTP's (0.25 mM each), 1 µM of each primer and 100 ng of genomic DNA. Reaction conditions were: 97°C for 4 min, (97°C for 45s, 52°C for 45s and 72°C for 45s) x 35 cycles followed by an incubation at 72°C for 10 min. The amplified products were visualized on a 0.8% (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide. Sequencing reactions were performed by Macrogen (Seoul, Korea). Primers used for sequencing are listed in Coenye *et al.* (1999).The obtained sequences were compared for similarity with sequences present in the public sequence databases as well as with EzTaxon, a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S rRNA gene sequences from type strains (Chun *et al.* 2007). BLAST analysis was performed at the www.ncbi.nlm.nih.gov.

DNA-DNA hybridization analysis was performed between strain S10^T and its closest relatives based on the degree of 16S rRNA gene similarity and the inferred phylogeny. DNA-DNA hybridization with the high scoring (in EzTaxon) but ambiguous sequences for *S. almquistii* (AY999782), *S. althioticus* (AY999791) and *S. matensis* (AB184221) deemed not necessary because of their distant location in the phylogenetic tree (Fig. 2). DNA was isolated using a French pressure cell (Thermo Spectronic) and was purified by chromatography on hydroxyapatite as described by Cashion *et al.* (1977). DNA-DNA hybridization was carried out as described by De Ley *et al.* (1970) incorporating the modifications described by Huss *et*

al. (1983), using a model Cray 100 Bio UV/VIS-spectrophotometer equipped with a Peltier-thermostatted 6 x 6 multicell changer and a temperature controller with *in situ* temperature probe (Varian), as described in Wayne *et al.* (1987). All DNA-DNA hybridizations were done in duplicate and the reported results give the average of the two experiments.

For the phylogenetic analysis, 16S rDNA reference sequences for the type strains of closely related *Streptomyces* species were retrieved from GenBank, aligned with Clustal W2 (Higgins *et al.*, 1994), and phylogenetically analyzed with the parsimony DNAPARS, distance matrix DNADIST according to Kimura (1980), NEIGHBOR maximum likelihood, DNAML and bootstrapping, SEQBOOT CONSENSE tools from the PHYLIP package version 3.6 (Felsenstein, J. 2005). Phylogenetic trees were visualized using Dendroscope (Huson *et al.*, 2007).

Strain S10^T had morphological characteristics consistent with members of the genus *Streptomyces*. From light and electron microscopy, it was observed that strain S10^T had *Spirale*-type spore chains (Figure 1a) with Smooth spore surface ornamentation (Figure 1b). The chemotaxonomic characteristics of strain S10^T supported its classification as a member of the genus *Streptomyces* (Table 1). LL-diaminopimelic acid (DAP) and glycine were detected in its peptidoglycan. As usual for streptomycetes, the fatty acid profile comprised mainly of fatty acids of carbon chain with a length of 14-18 atoms (Lechevalier, 1977), in particular saturated iso- and anteiso-branched chain fatty acids: ai-C₁₅:0 (23.7 %), i-C₁₆:0 (19.5 %), ai-C₁₇:0 (13.7 %), i-C₁₅:0 (11.0 %), i-C₁₇:0 (6.5 %), i-C₁₄:0 (2.5 %) with only few unbranched fatty acids, C₁₆:0 (5.6 %), C₁₅:0 (2.3 %), C₁₇:0 (0.7 %) and C₁₄:0 (0.2 %). For comparison with the fatty acids profiles of closely related species see Table 1.

A BLAST search with 1462 bp 16S-rRNA gene sequence of strain S10^T, showed that it was more than 99% identical to 16S rRNA sequences of many members of to the genus *Streptomyces*, with the highest degree of similarity to *S. marokkonensis* LMG 23016^T (99.65%), *S. almqvistii* NRRL B-1685^T (99.58%), *S. althioticus* NRRL B-3981^T (99.51%), *S. matensis* NBRC 12889^T (99.51%), *S. aurantiogriseus* NRRL B-5416^T (99.32%), *Streptomyces lienomicini* NBRC 15425^T (99.24%), *S. coelescens* DSM 40421^T (99.20%), and. *S. violaceolatus* DSM 40438^T (99.18%). Five of these strains were selected for DNA-DNA hybridizations, which in all cases yielded only low degrees of DNA-DNA similarity: *S. coelescens* DSM 40421^T 4.5%, *S. aurantiogriseus* DSM 40138^T 6.7%, *S. lienomicini* DSM 41475^T 8.7 %, *S. violaveolatus* DSM 40438^T 10.1%, *S. marokkonensis* DSM 41918^T 33.4%. When applying the recommended threshold of 70% DNA-DNA similarity as proposed by Wayne *et al.*(1987), strain S10^T can be differentiate from its five closest neighbours.

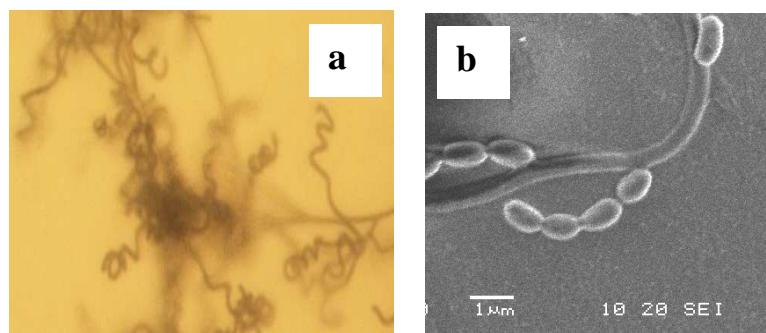


Figure 1: Micrographs showing spore chains (a) and spores shape (b) of *Streptomyces thinghirensis* sp. nov. grown on ISP2 for 14 days at 28 °C.

Table 1. Fatty acid pattern of strain 10^T, *S. marokkonensis* (DSM 41918^T), *S. lienomycini* (DSM 41475^T), *S. aurantiogriseus* (DSM 40138^T), *S. coelescens* (DSM 40421^T), and *S. violaceolatus* (DSM 40438^T).

Fatty acid (%)	S10 ^T	DSM 41918 ^T	DSM 41475 ^T	DSM 40138 ^T	DSM 40421 ^T	DSM 40438 ^T
13:0 ISO	0.14	0.11	0.12	0.31	0.17	0.18
13:0						
ANTEISO	0.19	0.45	0.38	0.48	0.60	0.56
14:0 ISO	2.54	2.05	3.97	1.46	4.58	4.63
14:0	0.19	0.49	0.43	0.24	0.37	0.45
15:1						
ANTEISO A	-	0.50	-	-	-	-
15:0 ISO	10.95	5.00	6.89	14.70	7.83	8.22
15:0						
ANTEISO	23.73	25.70	35.60	25.62	32.02	32.69
15:0 B	0.22	0.16	0.26	-	-	-
15:0	-	-	4.05	2.21	2.53	3.38
15:0 ISO H	1.59	1.40	-	-	-	-
16:1 ISO H	-	-	2.06	1.94	1.52	1.47
16:0 ISO	19.49	16.53	15.11	12.40	21.09	19.88
cis-9-16:1	2.64	3.36	0.60	2.80	1.79	2.34
16:0	5.57	10.91	9.19	3.56	7.09	7.27
16:0 9?						
METHYL	4.15	1.13	0.65	4.89	1.07	1.06
16:1						
ANTEISO C	2.97	3.01	1.74	-	-	-
17:1						
ANTEISO C	-	-	-	5.76	1.97	1.78
17:0 ISO	6.48	2.60	2.61	5.18	2.76	2.63
17:0						
ANTEISO	13.66	17.84	13.32	16.17	11.92	10.93
cis-9-17:1	0.66	1.29	0.20	0.94	0.38	0.90
17:0 CYCLO	1.17	0.60	1.38	0.35	1.00	0.74
17:0	0.69	1.70	0.90	0.57	0.56	0.52
Unknown						
17.595 SM	0.40	-	0.36	-	-	-
17:0 ISO 2-OH	0.15	-	0.16	-	0.10	-

Abbreviations: cis-9-16:1, cis-9-hexadecenoic acid (palmitoleic acid)

¹unknown lipid eluting at an equivalent chain length of 17.595

Phylogenetic analysis showed that strain S10^T is most closely related to *Streptomyces marokkonensis* LMG 23016^T and that both strains branch off separately below from the *S. violaceoruber* species group (Figure 2).

A comparison of the phenotypic characteristics of strain S10^T and the strains with the top BLAST results is shown in Table 2. It is clear from these comparisons that strain S10^T is phenotypically different from the closest related *Streptomyces* species. Additional phenotypic properties of the isolate are given in the species description section.

From the phenotypic and genotypic data obtained, it is proposed that strain S10^T represents a novel species within the genus *Streptomyces*. The name *Streptomyces thinghirensis* sp. nov. is proposed with strain S10^T as the type strain.

Description of *Streptomyces thinghirensis* sp. nov. *Streptomyces thinghirensis* (thin.ghir.en.sis: N.L. gen. masc. n. thinghirensis of Thinghir, named after town in Southern Morocco where the strain was isolated.

Hyphae were abundant and well-developed. A yellow diffusible pigment is produced on all test media and yellow substrate mycelium and white-gray aerial mycelium is visible. No melanin production is observed on peptone-yeast extract-iron agar (ISP 6) and tyrosine agar (ISP 7). Good growth is observed on ISP2 agar. Gelatin is not liquefied. Milk is coagulated and peptonized. H₂S is not produced. Nitrate is reduced.

D-fructose, D-galactose, D-glucose, D-mannitol, D-mannose, Myo-inositol, L-rhamnose, D-sorbitol, are utilized as sole carbon sources. D- saccharose, Maltose, D- lactose, D-cellobiose, while D- arabinose, D-xylose and D-raffinose are not utilized as sole carbon source. Growth occurs from 28 to 42°C, pH 5-10, and in presence of sodium chloride 7%. Resistance t

— 0.0010

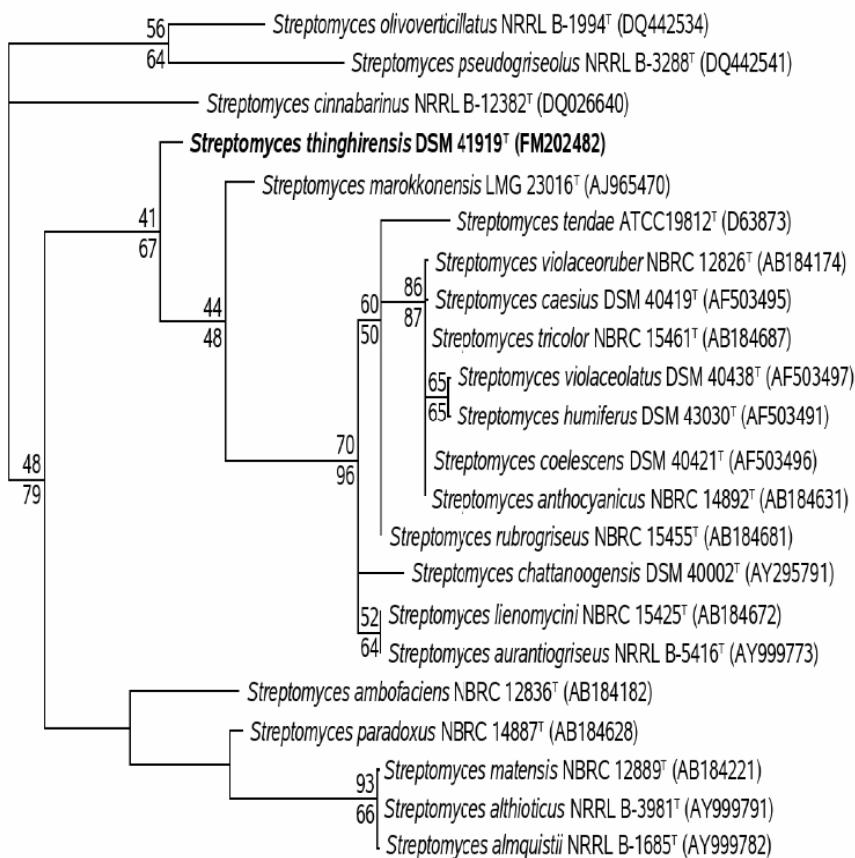


Figure 2: Unrooted Maximum Likelihood phylogeny based on 1436 aligned positions of 16S rRNA gene showing the phylogenetic relationships between strain S10^T (DSM41919^T, ‘*Streptomyces thinghirensis*’) and the most closely related *Streptomyces* type species. Bootstrap values (%) above the branches were derived from 1000 replications of maximum likelihood inferences, those below the branches give the maximum support by 1000 replications, each, of maximum parsimony, neighbour-joining, and least square (FITCH) inferences. The scale bar corresponds to 0.001 substitutions per nucleotide position.

Table 2. Physiological characteristics of strain S10^T and its phylogenetic neighbours1 S10^T; 2, *S.marokkonensis* LMG23016^T; 3, *S. coelescens* DSM40421^T; 4, *S. violaceolatus*DSM 40438^T; 5, *S. lienomycini* DSM41475^T; 6, *S. aurantiogriseus* DSM 40138^T

Characteristics	1	2	3	4	5	6
Aerial mass colour	WG	G	G	Br	G	RG
Substrate mycelium	Y	G	G-Br	Gr	Cs	B
Reverse side pigment	Y	-	+	+	-	RA-Sp
Diffusible pigment	+	-	+	+	-	+
Melanin pigments	-	-	-	-	+	-
Utilization of						
Arabinose	-	±	+	+	+	+
Lactose	±	+	-	-	+	+
Myo-inositol	+	-	+	-	+	+
Raffinose	-	-	±	-	+	+
Rhamnose	+	+	+	-	+	+
Sucrose	±	+	+	-	+	+
Xylose	±	+	+	+	+	+
Degradation of esculin	+	-	+	+	+	+
Growth in presence of						
7% NaCl	+	+	-	-	+	-

+: well utilized, ±: poorly utilized, -: not utilized,

B, blue; Br, Brownish; Cs, colourless; G, grey; G-Br, grey-Brown; RG, red-grey; W, white;
WG, White-grey; Y, yellow.

ampicillin (10 µg/ml), amoxicillin (10 µg/ml), nalidixic acid (30 µg/ml), penicillin G (10 µg/ml), sulfamide (25 µg/ml) and rifampicin (5 µg/ml) but sensitive to novobiocin (30 µg/ml), gentamycin (10 µg/ml) and streptomycin (10 µg/ml). Active against moulds; *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, , *Pythium ultimum*, *Sclerotium rolfsii*, and *Verticillium dahliae*, yeasts, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Saccharomyces cerevisiae*, bacteria, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Streptomyces scabies*.

The type strain is *Streptomyces thinghirensis* S10^T (= CCMM b35^T = DSM 41919^T).

Acknowledgements

This work was supported by the Moroccan-Belgium project: FRAB/ CCMM2.

We are grateful to Professor Pr. Outzoughite A. (Electron Microscope Unit, Faculty of Science of Marrakesh) for his help in scanning electron observation.

References

- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. & Turk, M. (1966).** Antibiotic susceptibility testing by standard single disk method. *Am J Clin Pathol* **45**, 493-496.
- Breccia, J. D., Castro, G. R., Badger, M. D. & Siñeriz, F.(1995).** Screening of xylanolytic bacteria using a colour plate method. *J Appl Bacteriol* **78**, 469-472.
- Cao L., Qiu Z., You J., Tan H. & Zhou S. (2005).** Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiol Lett* **247**, 147–152
- Cashion, P., Hodler-Franklin, M. A., McCully, J. & Franklin, M. (1977).** A rapid method for base ratio determination of bacterial DNA. *Anal Biochem* **81**, 461-466.
- Chun, J., Lee, J.-H., Jung, Y., Kim, M., Kin, S., Kim B. K & Lim, Y.-W. (2007).** EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2259-2261.
- Chun, J., Youn, H. -D., Yim, Y.-I., Lee, H., Kim, M.Y., Hah, Y.C. & kang, S.-O. (1997).** *Streptomyces seoulensis* sp.nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 492-498.
- Coenye, T., Falsen, E., Vancanneyt, M., Hoste, B., Govan, J. R. W., Kersters, K. & Vandamme P. (1999).** Classification of *Alcaligenes faecalis*-like isolates from the environment and human clinical samples as *Ralstonia gilardii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 405-413.
- Copping, L. G. & Menn, J. J. (2000).** Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Manage Sc* **56**, 651-676.
- De Ley, J., Cattoir, H. & Reynaerts, A. (1970).** The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem* **12**, 133-142.
- Donadio, S., Carrano, L., Brandi, L., Serina, S., Soffientini, A., Raimondi, E., Montanini, N., Sosio, M. & Gualerzi, C.-O. (2002).** Targets and assays for discovering novel antibacterial agents. *J Biotechnol* **99**, 175-185.

El-Tarably, KA., Sivasithamparam, K.(2006). Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol Biochem* **38**, 1505–1520.

Felsenstein, J. (2005). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.

Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J., (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.

Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Huson, D. H., Richter, D. C., Rausch, C., Dezulian, T., Franz, M., Rupp, R. (2007). Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics* **8**, 460.

Huss, V. A. R., Festl, H. & Schleifer, K. H. (1983). Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst Appl Microbiol* **4**, 184-192.

Jones, J. (1949). Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *J Bacteriol* **57**, 141-145.

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

Klatte, S., Kroppenstedt, R. M. & Rainey, F. A. (1994). *Rhodococcus opacus* sp. nov.. an unusual nutritionally versatile *Rhodococcus*-species. *Syst Appl Microbiol* **17**, 355-360.

Ko, W.H., Wang, I.T. & Ann., P.J. (2005). A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil Biology Biochemistry* **37**, 597-599.

Labeda, D.P., Lechevalier, M.P. & Testa, R.T. (1997). *Streptomyces stramineus* sp.nov., a new species of the verticillate streptomycetes. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 747-753.

Lazzarini,A., Cavaletti, L.,Toppo, G. & Marinelli, F. (2000).Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek* **78**, 399-405.

Lechevalier, M. P. (1977). Lipids in bacterial taxonomy – a taxonomist's view. *CRC Crit Rev Microbiol* **5**, 109-210.

Lechevalier, M. P. & Lechevalier, H. A. (1980). The chemotaxonomy of actinomycetes. In Actinomycetes Taxonomy: Society for Industrial Microbiology Special Publication Number A6, eds. Dietz, A. & Thayer, D. W. pp. 225-292. Arlington, Virginia Society of Industrial Microbiology.

Liu, D., Coloe, S., Baird, R. & Pedersen, J. (2000). Rapid Mini-Preparation of Fungal DNA for PCR. *J Clin Microbiol* **38**, 471.

Locci, R. (1994) Actinomycetes as plant pathogens. *Eur J Plant Pathol* **100**, 179–200.

Loqman, S., Ait barka, E.,Clément,C. & Ouhdouch, Y. (2009). Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. *World J of Microbiol Biotechnol* **25**, 81-91

Maskey, R. P., Li, F.C., Qin, S., Fiebig, H. H. & Latsch, H. (2003). Chandrananimycins A~C: Production of novel anticancer antibiotics from a marine *Actinomadura* sp. Isolate M048 by variation medium composition and growth conditions. *J antibiot* **56**, 622-629.

Newman, D. J., Cragg, G. M. & Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* **66**, 1022-1037.

Nonomura, H. (1974). Key for classification and identification of 485 species of the streptomycetes included in the ISP *J Ferment Technol* **52**, 78-92.

Oakley B., North M., Franklin JF., Hedlund BF. & Staley JT. (2004) Diversity and distribution of *Frankia* strains symbiotic with *Ceanothus* in California. *Appl Environr Microbiol* **70**, 6444–6452.

Olson, E. H. (1968) Actinomycetes Isolation Agar. Difco: Supplementary Literature. *Difco Lab., Detroit, Michigan.*

Ouhdouch, Y., Brakate, M. & Finance, C. (2001). Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. *Eur J Soil Biol* **37**, 69-74.

Prauser, H. (1964). Aptness and application of colour for exact description of colours of *Streptomyces*. *Z All Mikrobiol* **4**, 95-98.

Sardi, P., Saracchi, M., Quaroni, S., Petrolini, B., Borgonovi, GE. & Nesli S. (1992) Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. *Appl Environr Microbiol* **58**, 2691-2698

Sasser, M. (1990). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Technical note 101. Newark, DE: Microbial ID.

Shirling, E. B. & Gottlieb, D. D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces*. *Int J Syst Bact* **6**, 313-340.

Tanaka Y. & Omura S. (1993) Agroactive compounds of microbial origin. *Annu Rev Microbiol* **47**, 57-87.

Tresner, H. D., Hayes, J. A. & Backus, E. J. (1968). Differential tolerance of *Streptomyces* to sodium chloride as a taxonomic aid. *Appl Microb* **16**, 1134-1138.

Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M. & Bhole, B. D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol* **176**, 386-390.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. & Trüper, H. G. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 463-464.

CHAPITRE IV

Purification et élucidation structurale de quelques antibiotiques produits par une des souches d'Actinomycètes sélectionnées

Publication 5:

Purification of antibiotics from antagonistic *Streptomyces* sp. nov., a novel *Streptomyces* isolated from rhizospherical soil of Moroccan healthy *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography

Auteurs: Souad Loqman, Alix Toribio, Dominique Harakat, Jean-Marc Nuzillard, Jean-Hugues Renault, Essaid Ait Barka, Christophe Clément, Yedir Ouhdouch.

Journal : Journal of Chromatography B

Parmi les souches d'actinomycètes PGPR endophytes à activité antifongique que nous avons sélectionnées au cours de notre programme de criblage, la souche SS38 a montré une très grande activité vis-à-vis de *Botrytis cinerea* agent de la pourriture grise. Cette souche a été retenue pour des investigations complémentaires concernant la purification et la détermination de la structure moléculaire des principes actifs élaborés.

L'isolat SS38 a été mis en culture sur le milieu liquide de Bennett, favorable à la production des antibiotiques. L'antifongique produit a été extrait à partir de ce milieu en utilisant le n-butanol. Les tests biologiques réalisés à partir de cet extrait butanolique de la souche *Streptomyces* sp. nov. ont montré d'excellents résultats concernant l'inhibition *in vitro* et *in vivo* de la croissance de *Botrytis cinerea*.

Pour l'extraction et la purification du (des) principe(s) actif(s), un préfractionnement (liquide-liquide) bio guidé a été d'abord effectué avant l'opération de purification visant à isoler les composés antifongiques. Ce préfractionnement a eu pour but d'obtenir une fraction contenant les composés ayant l'activité biologique la plus importante.

Pour cela, les composés actifs de l'extrait ont dû être identifiés par bioautographie. Cette dernière technique a consisté en la séparation des différents constituants de l'extrait brut par CCM (phase normale Si60 Merck, éluant : CH₂Cl₂/CH₃OH, 1 :9 v/v, révélateur : acide sulfurique ou vanilline sulfurisée) puis l'évaluation de leur activité directement sur plaque. Ainsi, une première plaque de référence a été développée à l'aide de la phase éluante puis révélée par pulvérisation d'acide sulfurique et chauffée. Les rapports frontaux des différents composés ont été notés. Une seconde plaque, développée dans le même éluant a étéensemencée par un milieu de culture gélosé PDA (Potato Dextrose Agar 7%) contenant une suspension de *Botrytis cinerea*. Les composés actifs ont laissé plusieurs zones sur la plaque (centrées sur certains rapports frontaux Rf) dans laquelle l'agent fongique était détruit.

Deux systèmes de solvants différents ont été étudiés en vue du préfractionnement. Il s'agit du système triphasique n-Hept/ MtBE/ CH₃CN/ Eau (1 :1 :2 :1, v/v) et du système biphasique n-Hept/ CH₃OH/ Eau (5 :1.5 :3.5, v/v).

A l'aide de 600 ml (3×200 ml) de système triphasique (ou biphasique), l'extrait butanolique primaire a été fractionné en trois phases.

Pour la purification du (des) principe(s) actif(s), on a utilisé la CPC (la Chromatographie de Partage Centrifuge) ; il s'agit d'une technique chromatographique liquide -liquide sans support solide, basée sur les différences de partage des solutés entre deux phases non miscibles. La phase stationnaire liquide est maintenue dans des cellules orientées radialement présentes dans la colonne chromatographique par un champ de forces centrifuges appliqué par rotation autour d'un axe unique. La phase mobile est pompée au travers jusqu'à atteindre un équilibre stable entre les volumes de phase stationnaire V_{stat} et de phase mobile V_{mob} .

Six molécules sont purifiées en quantité importante à partir d'un seul extrait dont 5 ont montré une activité vis-à-vis de *Botrytis cinerea* *in vitro*.

Purification of antibiotics from antagonistic *Streptomyces* sp. nov., a novel *Streptomyces* isolated from rhizospherical soil of Moroccan healthy *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography

Souad Loqman^{1, 2, 3}, Alix Toribio², Dominique Harakat², Jean-Marc Nuzillard², Jean-Hugues Renault^{2*}, Essaid Ait Barka³, Christophe Clément³, Yedir Ouhdouch¹

(1) Faculté de Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad (UCAM), Laboratoire de Biologie et de Biotechnologie des Microorganismes, Marrakech Maroc.

(2) FRE CNRS 2715, IFR 53, School of Pharmacy, University of Reims Champagne-Ardenne, Bât. 18, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, FRANCE

(3) Laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes, Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne, UFR Sciences – UPRES EA 2069, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51687 Reims Cedex 2, France.

* Corresponding author: e-mail address: jh.renault@univ-reims.fr

ABSTRACT

An actinomycete strain (designated SS38) isolated from rhizospherical soil of Moroccan *Vitis vinifera* soil was previously selected as the most antagonistic Actinomycetes against *Botrytis cinerea*, as a potential produced of antifungal metabolites, as the most endophytic and as the most growth promoting PGPR on the grapevines plantlets (unpublished data). Phylogenetic analysis based on the almost complete 16S rRNA gene sequence indicated that strain SS38 belongs to the genus *Streptomyces* DNA–DNA relatedness and phenotypic data distinguished strain SS38 from these phylogenetically represents a novel species of the genus *Streptomyces* (unpublished data). The antifungal compound produced by this strain was purified by centrifugal partition chromatography.

Extraction of the antimicrobial agent was performed on culture supernatant by the organic solvents. The Bioassay guided liquid-liquid prefractionation had to simplify the initial n-butanol extract by while enriching it of the active constituent. The simplified resulting extract was again fractional in CPC in order to the isolation and the purification of the actives molecules. Two consecutive experiences CPC were necessary to the purification of majority molecules of this extract. The solvent system of the range Arizona permitted the isolation of the compounds 2, 5, 6 and 10 while the new other system gleamed succeeded to the purification of the molecules 3, 4 and 7. The structural determination of the different isolated pure substances is currently under assessment.

However, the biologic tests achieved on each of the isolated products already permitted to conclude as for the importance of their property elicitrice and/or their inhibitory activity *in vitro* on the growth of *Botrytis cinerea*. Indeed, he/it proves to be that each of the isolated products active a way different of stimulation of the defenses natural of the infected plants. Otherwise, the preventive or curative treatments of plantules affected by gray rot from formulations containing the isolated products gave excellent results for the majority of these (unpublished data).

INTRODUCTION

Fungal pathogens are a major problem in the cultivation of grapevines around the world. Fungal attacks reduce yield and quality of fruits, either by a direct infection of berries or by a reduction of plant vigor. Gray mould diseases caused by *Botrytis cinerea* are probably the most common and widely distributed diseases of vegetables, ornamental plants, fruits, and even field crops throughout the world. Control of *Botrytis cinerea* through chemical sprays has been only partially successful. Furthermore, there is a risk of appearance and establishment of resistant *Botrytis cinerea* sp. strains to these chemicals. As a result, the legislation in most countries is becoming more severe. This has led to an increasing need for alternative technique that does not leave any residues. The development of resistance to multiple drugs is a major problem in the treatment of numerous pathogenic microorganisms. This antimicrobial resistance is presently an urgent focus of research and new bioactive compounds are necessary to combat these pathogens. Filamentous soil bacteria belonging to the genus *Streptomyces* are rich sources of high number of bioactive natural products with biological activity which are extensively used as pharmaceuticals and agrochemicals. These bacteria produce about 75% of commercially and medically useful antibiotics [1] and approximately 60% of antibiotics which have been developed for agricultural use were isolates from *Streptomyces* species [2]. This fact has made *Streptomyces* the most used bacteria in fermentation manufacturing of active pharmaceutical compounds.

Streptomyces are Gram-positive bacteria, characterized by complex morphologic differentiation cycle and accompanied by the production of many important bioactive substances of high commercial value having great structural and functional diversity [3], including antibiotics, antifungal, antiviral, anticancer, immunosuppressant agents, insecticides, herbicides, etc.

In the course of our screening programme for new Actinomycete strains, possessing antifungal activities, from the unknown Moroccan habitats. We previously selected *Streptomyces* sp. SS38 strain as the most antagonistic Actinomycetes against *Botrytis cinerea* [3], as a potential producer of antifungal metabolites, as the most endophytic and as the most growth promoting PGPR on the grapevines plantlets (unpublished data). Phylogenetic analysis based on the almost complete 16S rRNA gene sequence indicated that strain SS38 belongs to the genus *Streptomyces*, DNA-DNA relatedness and phenotypic data distinguished strain SS38 from these phylogenetically represents a novel species of the genus *Streptomyces* (unpublished data). We describe in this paper the successful separation and purification of antibiotics from these strains by centrifugal partition chromatography.

EXPERIMENTAL

Actinomycete sp. cell culture

SS38 *Streptomyces* sp. nov. related strain used in this study was previously isolated from rhizospherical soil of Moroccan *Vitis vinifera* soil strongly inhibit growth of *Botrytis cinerea* [4]. Spores of this strain, stored in 20% sterile glycerol at – 20°C, were used to inoculate (at 10⁶ spores ml⁻¹) cultures of liquid Bennett medium consisting of beef extract (Merk) 1 g/l; glucose (Merk) 10 g/l; peptone (Merk) 2 g/l; yeast extract (Merk) 1 g/l, pH 7.3. 3 liter Cultures were grown for 6 days at 28°C under constant agitation on a rotary shaker (180 rpm / minute).

Antibiotics extraction

As maximum antibiotic production was observed on the 6th day of the incubation, cultures was terminated on the 6th day and the broth was centrifuged at 10,000 x g for 20 min to separate the mycelial biomass. Different solvents were tested for the extraction of the antibiotics from the culture supernatant. The solvent used were n-butanol, ethyl acetate, n-hexane, dichloromethane, methanol, chloroform. The organic extracts were evaporated to dryness using a Rotavapor (Laborota 4000). The resulting dry extracts were recuperated in methanol and subjected to biological assay (disk of 6 mm in diameter) against *Bacillus subtilis* (40 µl per disk) and *Botrytis cinerea* (60 µl per disk). The n-butanol solvent gave the highest inhibition diameter were then retained for the detection of antibiotics by bioautography [5]. For this, 40 µl (*Bacillus subtilis*) or 60 µl (*Botrytis cinerea*) of n-butanol extract were spotted onto 20 x 20-cm silica gel plates (Merck Art. 5735, Kiesselgel 60F254), and then developed with CH₂Cl₂/CH₃OH (1:9 v/v). The developed TLC plates were air-dried overnight at 37 °C to remove all traces of solvent. They were then placed in plastic bioassay dish (23 x 23 x 2.2 cm³, Fisher Scientific Labosi) and overlaid with 150 ml of nutrient agar or PDA agar media (containing 7 g/l of agar) seeded respectively with *Bacillus subtilis* or

Botrytis cinerea. After the agar had set, the plate was inoculated at 30 °C. the inhibition zones of the active fraction were determined after 24 h of incubation for the *Botrytis cinerea* and after 48 h for *Bacillus subtilis*. Clear areas due to inhibition of microorganism growth indicated the location of antibiotic compounds on the TLC plates. The retention factor (Rf) of each spot was recorded.

Bioassay guided liquid-liquid prefractionation

Two different systems solvent have been studied in view of the prefractionation. It is about the triphasic system n-Hept / MtBE / CH₃CN / Water (1 :1 :2 :1, v/v) and of the biphasic system n-Hept / CH₃OH / Water (5 :1.5 :3.5, v/v).

The n-butanol extract was evaporated to dryness, the dry residue (8,8 g) was dissolved in a small volume of methanol and was submitted to liquid-liquid fractionation using for each extraction, 600mL of the ternary biphasic solvent mixture n-Heptane/ Methanol/ water (5: 1.5: 3.5, v/v) (or triphasic system). After 4 time extractions, the collected upper organic phases were regrouped and evaporated to dryness. About 1.4 g of the later residue was obtained. It was then stored for 24 hours at – 10 °C prior to use in CPC.

CPC Apparatus

The separations were performed on a FCPC® Kromaton Technologies apparatus (Angers, France) (Fig. 1), using a rotor of 20 circular partition disks (1320 partition cells, column capacity: 200 mL). Rotation speed can be adjusted from 200 to 2000 rpm, producing a centrifugal force field in the partition cell of about 120 g at 1000 rpm and 470 g at 2000 rpm. The solvents were pumped by a Dionex P580HPG 4-ways binary high-pressure gradient pump (Sunnyvale, CA, USA). The samples were introduced into the CPC column *via* a low pressure injection valve (Upchurch, CIL Cluzeau, Sainte-Foy-La-Grande, France) equipped



Figure 1 : FCPC Kromaton Technologies®

with a 21 mL sample loop. The effluent was monitored with a Dionex UVD 170S detector equipped with a preparative flow cell (6 μ L internal volume, path length of 2 mm). Fractions were collected by a Pharmacia Superfrac collector (Uppsala, Sweden). The experiments were conducted at room temperature ($22\pm1^\circ\text{C}$).

Preparation of Solvent Systems

The Arizona quaternary solvent system (R) composed of n-Heptane/ Ethyl acetate/ methanol/ water (2: 1: 2: 1, v/v) (experiment A) and the second biphasic system n-Heptane / acetonitrile/ water (5: 5: 4, v/v) (experiment B) were prepared by mixing the appropriate solvent in a separatory funnel, shaking them vigorously and allowing them to settle until the phases became limpid.

Preparation of Sample Solutions

1.4 g of the fractionated butanolic extract was dissolved in 10mL of organic phase and 10mL of aqueous phase.

CPC Experimental Conditions

First, in experiment A, the CPC column was filled with the aqueous stationary phase of the biphasic system. The sample solution was injected in the sample loop, the rotation speed was adjusted to 1300 rpm and the organic mobile phase was pumped at 6 mL/min. In the same way, in experiment B, separation was performed with the organic as the mobile phase at 1200 rpm and 3mL/min. The outgoing phase was monitored at 270 nm by the online UV detector for experiments A and B. For experiments A and B, respectively, the stationary phase retention was 75 and 70%, the back pressure was about 45 and 40 bars.

Fraction Analysis

CPC fraction analysis was performed using normal phase TLC (Merck Si60) with CHCl₃/ methanol (99: 1, v/v) as eluent. Plate visualization were realised thanks to sulfuric vanilline reagent (vanillin / H₂SO₄ concentrated/ Ethanol, 3/ 3/ 100, w/ v/v). The fractions containing pure compounds from the TLC analysis were regrouped. These fractions were submitted to ¹H and ¹³C NMR experiments. The spectra were recorded in CDCl₃ (¹H at 500 MHz and ¹³C at 125 MHz) on a Bruker Avance DRX 500. 2D (COSY, HSQC, HMBC...) experiments were performed using BRUKER microprograms. ESI-MS and HRESI-MS were obtained in a Micromass Q-TOF micro spectrometer apparatus.

RESULTS AND DISCUSSION

Bioassay guided liquid-liquid prefractionation

The Bioassay guided liquid-liquid prefractionation had to simplify the initial n-butanol extract by while enriching it of the active constituent. For it, we first used a system of triphasic solvent of n-Hept / MtBE / CH₃CN / Water (1: 1: 2: 1, v/v) classically employed in the industry for the dividing of surrounding culture (communication of the Dr R. Margraff). The primary excerpt could be thus fractional in groups of compounds of distinct polarities. The exam of each of the liquid phases collected, done by bioautography that wants to say then by chromatography on thin layer assessment of the activities of the products adsorbed on plate [5], revealed that the compounds least polar contents in the superior heptane phase and the intermediate phase rich in MtBE and CH₃CN were the most active. Indeed, these inhibit the growth of *Botrytis cinerea* in the middle of culture (Fig. 2).

The triphasic system succeeded therefore to separate three phases of which two (the superior and intermediate phase) contained the active compounds.

In order to simplify this prefractionation, a second biphasic solvent system has been tested with success to separate the active of those inactive substances. It is about the system constituted with the mixture of: n-Hept / CH₃OH / Water, 5 :1,5 :3,5, v/v. This last system presents the advantage to be more selective opposite the active compounds of the extract and is less expensive in solvent than the triphasic system previously (Fig. 3). It has been preferred therefore at last for the liquid prefractionation.

Isolation of the active molecules by CPC

To the descended of the prefractionation of the butanolic extract of *Streptomyces* sp., a first system of solvents has been selected from the systems of the Arizona range in order to be used in CPC. The R system (n-Hept / AcOEt / CH₃OH / Water, 2 :1 :2 :1, v/v) some Arizona range has been kept in first intention. Constants of distribution of the order of the unit have been gotten with this system for the majority of the active compounds of the prefractionated extract.



Figure 2: The Thin Layer Chromatography analysis illustration on each of the phases gotten after liquid-liquid fractionation dividing of an butanolic extract of *Streptomyces* sp. containing some bioactifs and inactive compounds from the triphasic system n-Hept / MtBE / CH₃CN / Water (1/1/2/1, v/v); CCM normal phase eluted with CH₂Cl₂/CH₃OH (1 :9, v/v), revealed with sulphuric vanillin.

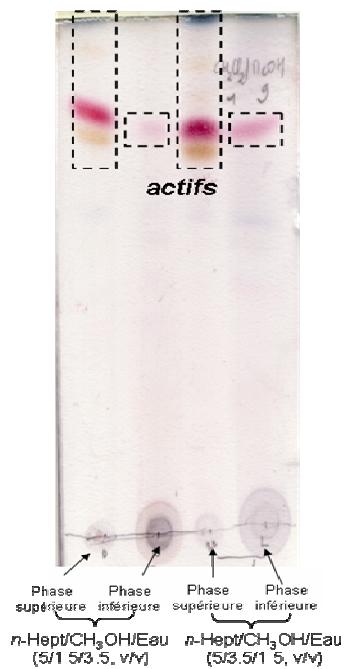


Figure 3 : The Thin Layer Chromatography analysis illustration on each of the phases gotten after liquid-liquid fractionation dividing of an butanolic extract of *Streptomyces* sp. containing some bioactifs and inactive compounds from the biphasic system n-Hept / CH₃OH / Water (5 :1,5 :3,5 and 5 :3,5 :1,5, v/v) ; CCM normal phase eluted with CH₂Cl₂/CH₃OH (1 :9, v/v), revealed with sulphuric vanillin.

On the one hand, isolation as pure compounds of 2, 5 and 6 was performed using conditions A in elution mode CPC with the biphasic solvent system composed of n-Heptane/Ethyl acetate/ methanol/ water as described above. Use then of the aqueous mobile phase as applying the strategy of the dual mode succeeded to the purification of the compound 10 that was until then retained by the stationary aqueous phase. This last compound challenged us. Indeed, its chromatographic comportment is inverse in CCM and in CPC ("polair" in CPC but "apolar" in CCM). Compounds 3, 4 and 7 could not be separated within these conditions. However, the collected fractions containing these molecules were regrouped and then re-injected in the CPC column so as to submit elution mode using conditions B. This manner, the 3 compounds were each successfully purified (Fig. 4).

The high selectivity (valued by CCM) generated by this mixture of solvent brought us therefore to choose it for tests in CPC purification. The mobile organic phase and the stationary aqueous phase, the three aimed products have can be separate in this manner (Fig. 5).

The collected fractions containing the same compounds have been regrouped (Table. 1). A control of the regrouped fractions has been achieved by CCM (Fig. 6). This one permitted to value the purity of the isolated compounds before submitting them then to the structural analysis and to the antimicrobial assays.

Structure elucidation

Among the different isolated compounds, some have sufficient quantities have been analyzed already in order to clarify their chemical structure. For it, of the analyses by nuclear magnetic resonance, spectrométrie of mass and X-rays have been done.

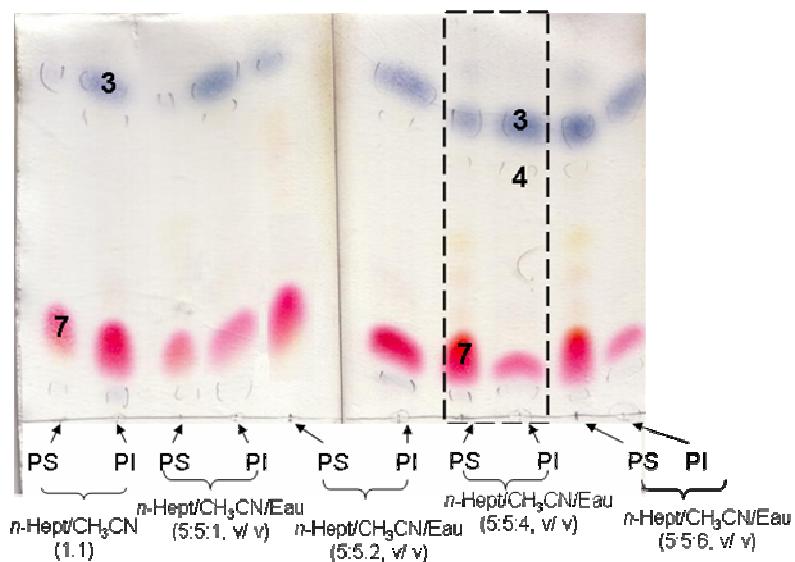


Figure 4: The Thin Layer Chromatography analysis illustration on each of the phases gotten after liquid-liquid fractionation dividing of an butanolic extract of *Streptomyces* sp. containing the compounds 3, 4 and 7 from the biphasic system n-Hept / CH₃CN (1 :1, v/v) and n-Hept / CH₃CN / Water (5 :5 :1; 5 :5 :2; 5 :5 :4 and 5 :5 :6, v/v); PS: superior phase, PI,: lower phase; CCM normal phase eluted with CH₂Cl₂/CH₃OH (1 :9, v/v), revealed with sulphuric vanillin.

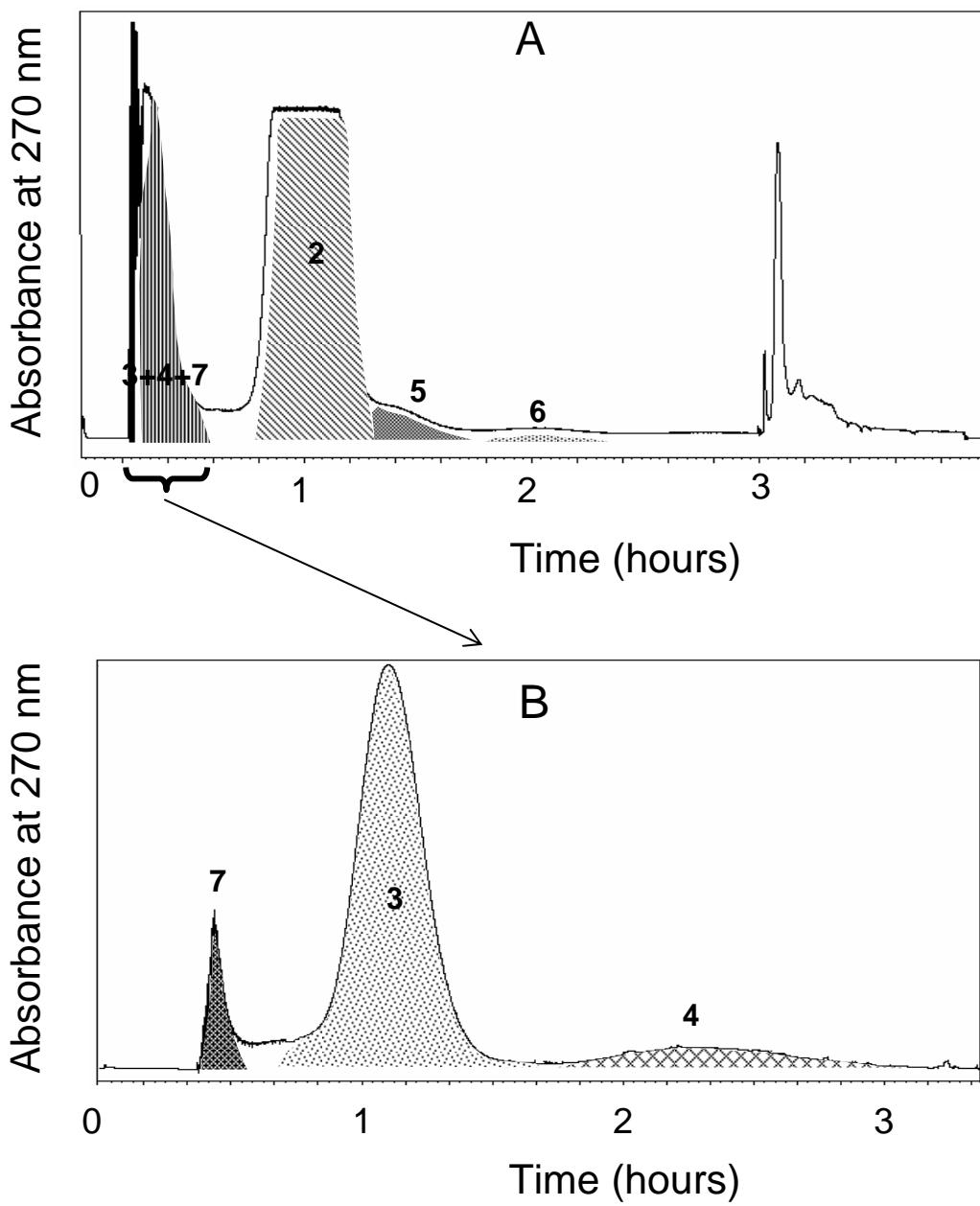


Figure 5: The chromatograms obtained from CPC experiments A and B.

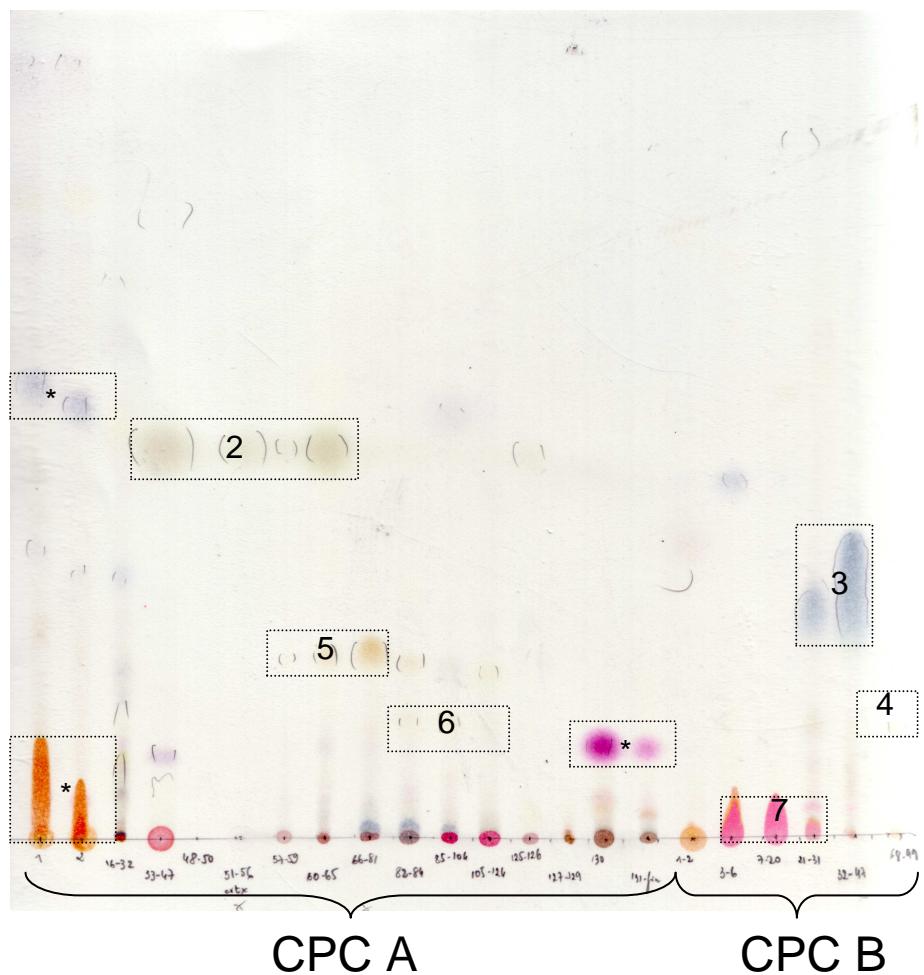


Figure 6: The Thin Layer Chromatography analysis illustration regrouped fractions containing the compounds 2, 3, 4, 5, 7 and unidentified substances isolated of an butanolic extract of *Streptomyces* sp. CCM normal phase eluted with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (1 :9, v/v), revealed with sulphuric vanillin.

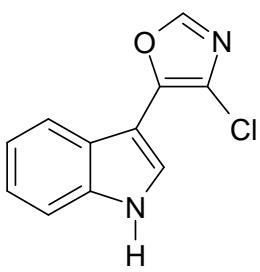
Table 1: Compounds isolated characteristics of the *Streptomyces* sp. butanolic extract by CPC.

Compounds Denomination	Coloration (sulphuric vanillin)	Isolated Quantity (mg)	Molecular Mass (g/ mol)	CPC Experience CPC
2	yellow-green	40,2	218	A
3	Bleu	52,8	415	B
4	yellow	23,8	399	B
5	Marron	1,6	437	A
6	Incolor	1,2	non determined	A
7	Rose	135,7	724	B
10	Incolor	10,2	410	(Dual Mode)

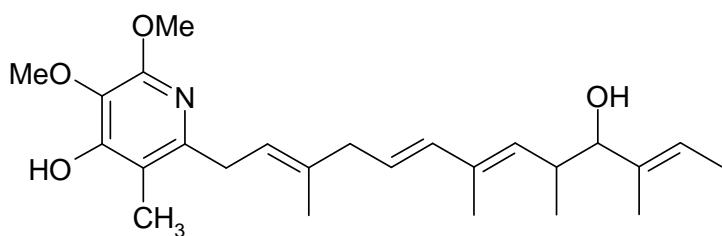
The structural determination of the other substances bioactives is currently in progress.

The figure 7 showed two structures has been determined of tow compounds (2 and 3). The structure of the compound 7 is under finalization (cf. below). The first findings show that it is probably about the abierixin previously isolated of *Steptomyces albus* (Fig. 8).

The *in vitro* antimicrobial activities, against *Botrytis cinerea* of these pure compounds were evaluated. Four of the six tested compounds show high activities against *Botrytis cinerea* (Fig. 9). The tow characterized molecules from the new isolated *Streptomyces* sp. SS38 strains have been already described from other microorganisms, we think that our strain is very interesting because it produces simultaneously all six important active molecules belonging to different families.



composé 2
4-Chloro-5-(3'-indolyl)oxazole



composé 3
Piericidin A1

Figure 7: chemical structure of the compounds 2 and 3 isolated of the *Streptomyces* sp. butanolic extract by CPC.

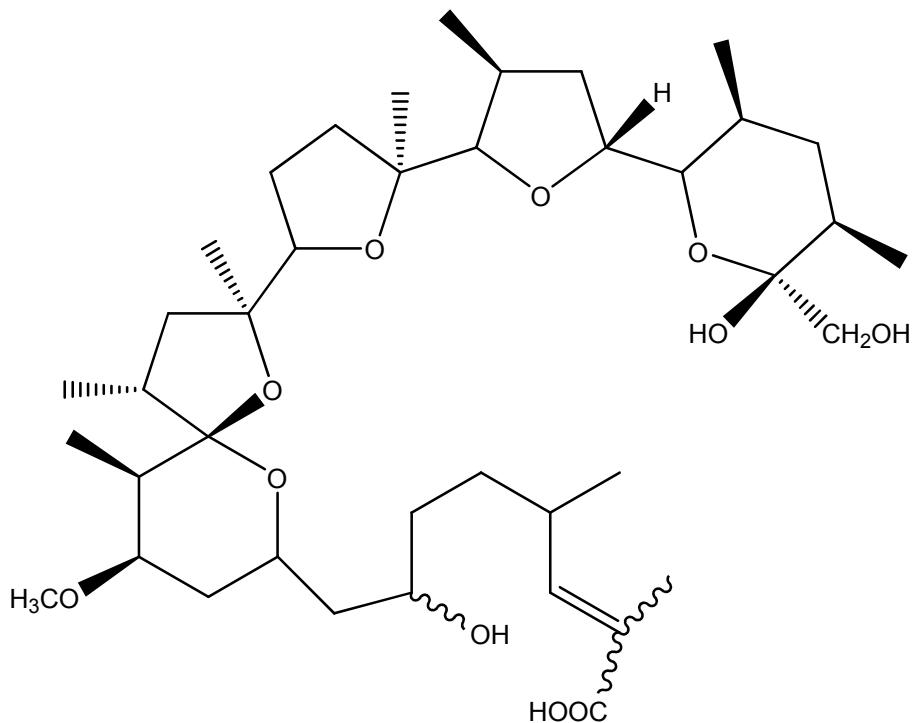


Figure 8: chemical structure ??? of the compound 7 isolated of the *Streptomyces* sp. butanolic extract by CPC.

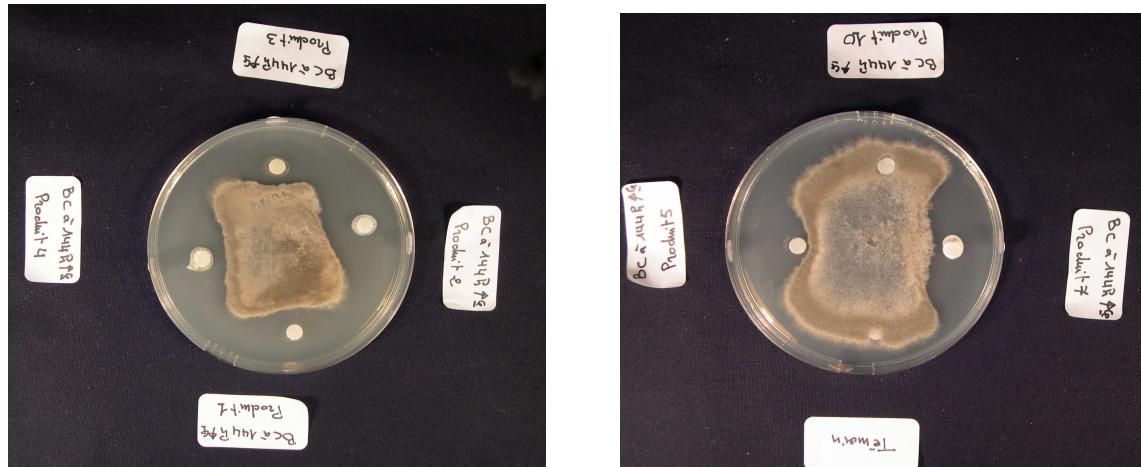


Figure 9: Antimicrobial activities of isolated compounds from the strain SS38 extract against *Botrytis cinerea* in solid media.

CONCLUSION

A search programm for antibiotics products of actinomycetes from Moroccan habitats led us to characterize strain SS38 isolated from rhizospherical soil of healthy *Vitis vinifera*.

The taxonomic characterization of the strain was carried out according to the recommended method of the International Streptomyces Project (Morphological, cultural and physical studies) completed by analysis of cell wall component and genetic determination. Phylogenetic analysis based on the almost complete 16S rRNA gene sequence indicated that strain SS38 belongs to the genus *Streptomyces*, DNA-DNA relatedness and phenotypic data distinguished strain SS38 from these phylogenetically represents a novel species of the genus *Streptomyces* (unpublished data).

Extraction of the antimicrobial agent was performed on culture supernatant by the organic solvents (n-butanol, ethyl acetate, n-hexane, dichloromethane, methanol, chloroform). The Bioassay guided liquid-liquid prefractionation had to simplify the initial n-butanol extract by while enriching it of the active constituent. The simplified resulting extract was again fractional in CPC in order to the isolation and the purification of the actives molecules. Two consecutive experiences CPC were necessary to the purification of majority molecules of this extract. The solvent system of the range Arizona n-Hept / AcOEt / CH₃OH / Water (2 :1 :2 :1, v/v) permitted the isolation of the compounds 2, 5, 6 and 10 while the new other system n-Hept / CH₃CN / Water (5 :5 :4, v/v) gleamed succeeded to the purification of the molecules 3, 4 and 7. The structural determination of the different isolated pure substances is currently under assessment.

However, the biologic tests achieved on each of the isolated products already permitted to conclude as for the importance of their property elicitrice and/or their inhibitory activity *in vitro* on the growth of *Botrytis cinerea*. Indeed, he/it proves to be

that each of the isolated products active a way different of stimulation of the defenses natural of the infected plants. Otherwise, the preventive or curative treatments of plantules affected by gray rot from formulations containing the isolated products gave excellent results for the majority of these (unpublished data).

REFERENCES

1. Miyadoc, S. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: A producing microorganisms approach. *Actinomycetologica* **1993**, 9, 100-106.
2. Tanaka, Y.T.; Mura, S.O. Agroactive compounds of microbial origin. *Annu. Rev. Microbial* **1993**, 47, 57-87.
3. Williams S.T.; Googfellow M.; Alderson G.; Wllington E.M.; Sneath P.H.; Sacki, M.J. Numerical classification of Streptomyces and related genera. *J Gen Microbiol* **1993**, 129, 1747-813.
4. Loqman, S., Ait barka, E.,Clément,C. & Ouhdouch, Y.. Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. *World J of Microbiol Biotechnol* **2009**, 25, 81-91.
5. Petersen, M.; Simmonds, M. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* **2003**, 62, 121-125.
6. Maciuk, A.; Renault, J.H.; Margraff, R.; Trébuchet, P.; Zèches-Hanrot, M.; Nuzillard, J.-M. Anion-Exchange Displacement Centrifugal Partition Chromatography. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 6179-6186.
7. Ilieva-Stoilova, M.P.; Pavlov, A.I.; Kovacheva-Apostolova, E.G.; In Lavender: *The genus Lavandula*, M. Lis-Balchin Ed., Taylor & Francis, London, **2002**, 214-226.
8. Linsmayer, E.M.; Skoog, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* **1965**, 18, 100-127.
9. Pavlov, A.I.; Ilieva, M.P.; Panchev, I.N. Nutrient Medium Optimization for Rosmarinic Acid Production by *Lavandula vera* MM Cell Suspension. *Biotechnology Progress* **2000**, 16, 668-670.
10. Marchal, L.; Intes, O.; Foucault, A. P.; Legrand, J.; Nuzillard, J.-M.; Renault, J.-H. Rational improvement of centrifugal partition chromatographic settings for the production of 5-n-alkylresorcinols from wheat bran lipid extract: I. Flooding conditions—optimizing the injection step. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1005, 51-62.
11. Chevrolot, L.; Collicec-Jouault, S.; Foucault, A. P.; Ratiskol, J.; Sinquin, C. Preliminary report on fractionation of fucans by ion-exchange displacement centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. B* **1998**, 706, 43-54.
12. Intes, O.; Renault, J.-H.; Sinquin, C.; Zèches-Hanrot, M.; Nuzillard, J.-M. Fractionation of low-molecular-mass heparin by centrifugal partition chromatography in the ion-exchange displacement mode. *J. Chromatogr. A* **2001**, 918, 47-57.

CHAPITRE V

Induction des mécanismes de défenses de la vigne par les produits purifiés élaborés par une des souches sélectionnées

Publication 6:

Induced defense responses in *Vitis vinifera* L. by *Streptomyces* sp. nov compounds and its related systemic resistance towards early infection by *Botrytis cinerea* Pers.

Auteurs: Souad Loqman, Fanjanirina Rabenoelina, Fabienne Baillieul, Jean Hugues Renault,

Jean-Marc Nuzillard, Essaid Ait Barka, Yedir Ouhdouch, Christophe Clément.

Journal : En préparation

Les plantes sont constamment soumises au cours de leur développement à l'attaque d'agents pathogènes, néanmoins elles sont résistantes à la plupart d'entre eux et la maladie est l'exception. Les plantes ont mis en place au cours de l'évolution des stratégies élaborées leur permettant de se défendre efficacement contre les agents pathogènes (virus, champignons, bactéries).

Lorsqu'un agent pathogène est détecté par la plante, dans la plupart des cas, la première caractéristique de la résistance à la maladie est la mort des cellules autour du site d'infection, appelée réponse hypersensible (RH) visant à confiner l'agent pathogène dans cette zone. Les cellules qui meurent émettent alors des molécules servant de signaux d'alerte, perçus par les cellules voisines qui mettent en place des mécanismes de défense qui consistent essentiellement en la production de molécules à activité antimicrobienne et en la mise en place de barrières physiques (callose, lignification, bourrelets cicatriciels) permettant de stopper la progression de l'agresseur (Wittstock et Gershenson, 2002 ; Jones et Dangl, 2006). Dans certains cas, cette résistance localisée est suivie par la mise en place d'une résistance dite systémique acquise (RSA) qui protège l'ensemble de la plante contre l'attaque ultérieure par une large gamme de parasites (bactérie, virus, champignons).

Parallèlement à la résistance systémique acquise (RSA), certaines souches de PGPR peuvent protéger les plantes d'une façon indirecte par la stimulation de mécanismes de défense inductibles dans la plante, ce qui peut rendre l'hôte beaucoup plus résistant à l'agression future par des agents pathogènes. Ce phénomène a été nommé «résistance systémique induite» (ISR, Induced Systemic Resistance) (van Loon *et al.*, 1998; Pieterse, CMJ. *et al.*, 2002). L'induction d'une telle capacité de défense est systémique : le traitement des racines par des PGPR produit des effets protecteurs sur d'autres parties de la plante sans migration des bactéries induisantes l'ISR au travers du système vasculaire de la plante ou à travers les tissus (Ramamoorthy *et al.*, 2001; Bent, 2005). La preuve du rôle d'une souche de PGPR en tant qu'inducteur de l'ISR dans la réduction d'une maladie est donc obtenue en garantissant une séparation spatiale de l'agent pathogène et de l'agent inducteur de la résistance, afin d'exclure toute interaction antagoniste directe. C'est le cas si l'on inocule les bactéries sur les racines et le pathogène sur la surface foliaire de la plante ou en utilisant des systèmes séparant les racines en deux groupes séparés (van Peer *et al.*, 1991; Zhou et Paulitz 1994; Bakker *et al.*, 2007). L'ISR est donc phénotypiquement similaire à la SAR. Cependant, il semble que les voies d'inductions de la SAR et l'ISR soient différentes même si toutes les

deux se basent sur la transmission d'un signal conduisant à l'activation d'un ensemble de mécanismes de défense. Les mécanismes développés par les plantes permettent de se protéger contre un large spectre de pathogènes pas seulement fongiques, bactériens et viraux, mais aussi vis-à-vis de maladies causées par certains insectes et nématodes (Sticher *et al.*, 1997; van Loon *et al.*, 1998; Ramamoorthy *et al.*, 2001; Durrant et Dong, 2004).

Cette "protection" présente donc un intérêt agronomique tout particulier puisque son induction artificielle chez les plantes pourrait être un moyen de limiter les apports de pesticides dans les champs. L'induction artificielle de cette protection est au centre des recherches menées ces dernières années sur ces mécanismes de défense des plantes qui visent à mieux connaître la nature des processus mis en jeux (inducteurs de défense) pour pouvoir à terme proposer des stratégies utilisables en agriculture.

Dans ce chapitre, nous avons montré que les produits sécrétés par une souche de *Streptomyces* sp. nov. induisent des réactions de défense dans des vitroplants de vigne ainsi qu'une résistance systémique contre l'infection par *B. cinerea*.

L'effet éliciteur et/ou protecteur de ces produits est évalué tout d'abord en étudiant leur effet antagoniste *in vitro* par les tests de confrontation à distance et locale sur boîte de pétri en présence de *B. cinerea*, puis par vaporisation des vitroplants de vigne botrytisé ou non. Ensuite, l'étude de l'expression des réponses de défense par RT-PCR quantitative en temps réel. Les gènes étudiés sont des gènes connus comme étant impliqués dans les réponses de défense chez la vigne et l'orge face à l'attaque de maladies. Les gènes testés ont été choisis de façon à pouvoir évaluer quelle voie de signalisation est activée (acide salicylique, acide jasmonique, éthylène) en réponse aux éliciteurs potentiels.

Les résultats obtenus ont montré que 5 des 6 produits testés montrent un pouvoir antagoniste locale (Figure 1) et à distance (Figure 2) vis-à-vis de *B. cinerea*. Cet effet est maintenu à l'échelle de la plante ; la vaporisation des vitroplants de vigne par ces produits les protège contre la pourriture grise. De plus le produit 10 en présence de la plante montre un effet vis-à-vis de *B. cinerea* (Figure 3).

Lors de cette étude, nous avons également mis en évidence, d'après les résultats préliminaires, une induction locale et systémique des gènes *VvGluc*, *VvPR6* et *VvChi4C* codant respectivement pour des protéines P-R2, PR-6 et PR-3 (Figure 4).

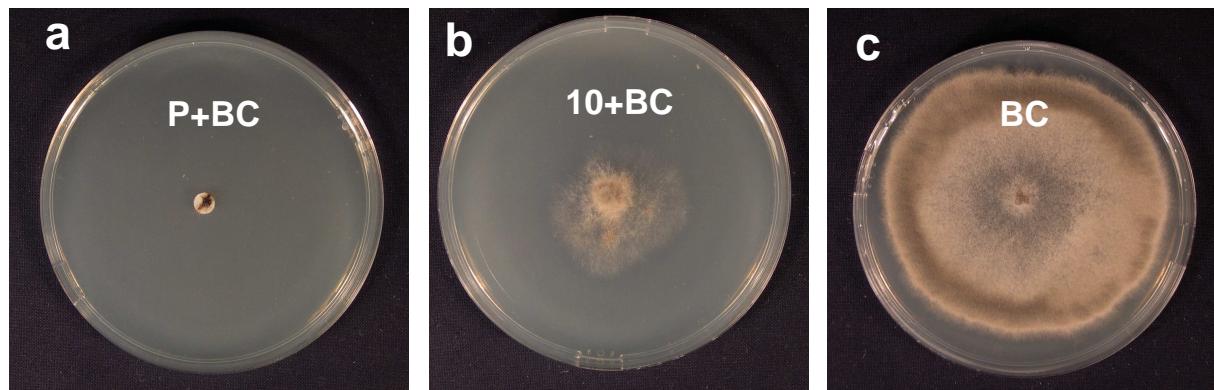


Figure 1: Effet des produits sécrétés par *Streptomyces* sp. nov. sur la croissance de *Botrytis cinerea* par le test de confrontation locale (a : effet des produits 2,3,4,5,7 ; b : effet du produit 10 ; c : Témoin ; BC : *Botrytis cinerea*).

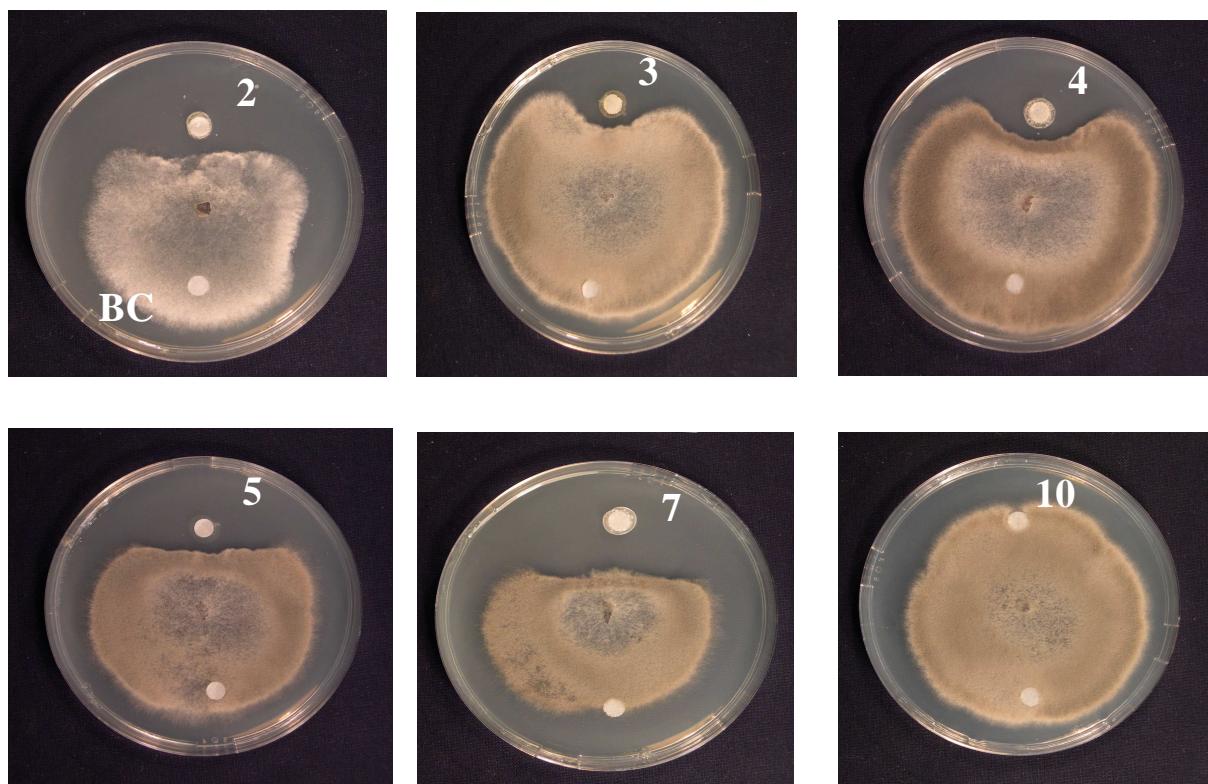


Figure 2: Effet des produits sécrétés par *Streptomyces* sp. nov. sur la croissance de *Botrytis cinerea* par le test de confrontation à distance (BC: *Botrytis cinerea* et 2,3,4,5,7 et 10 : les produits).

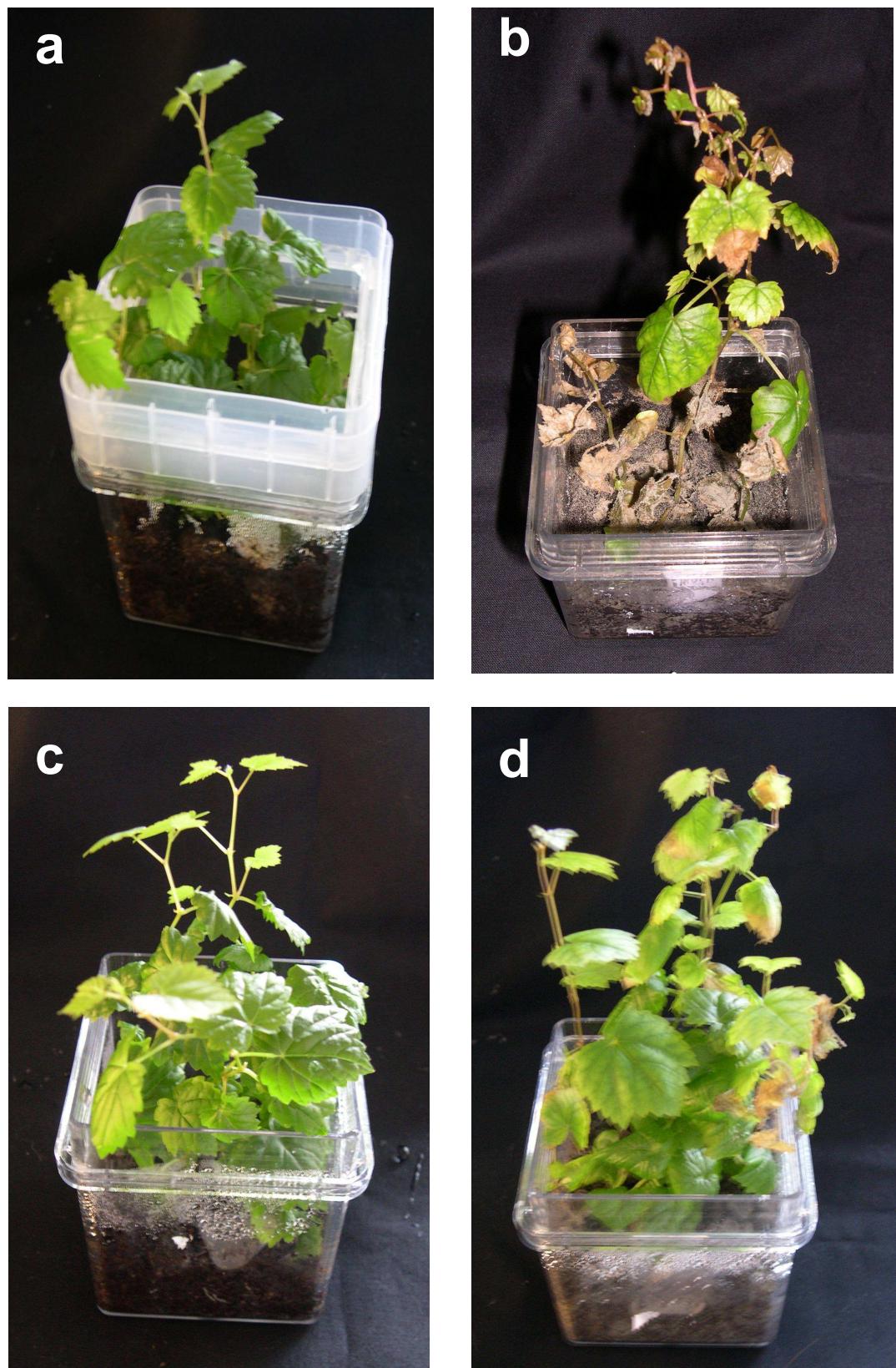


Figure 3: Effet des produits sécrétés par *Streptomyces* sp. nov. sur la protection des plantes vis-à-vis *Botrytis cinerea* (a : plante témoin, b : *Botrytis cinerea*, c : *Botrytis cinerea* + produit 2 ; d : 10 : effet du produit 10).

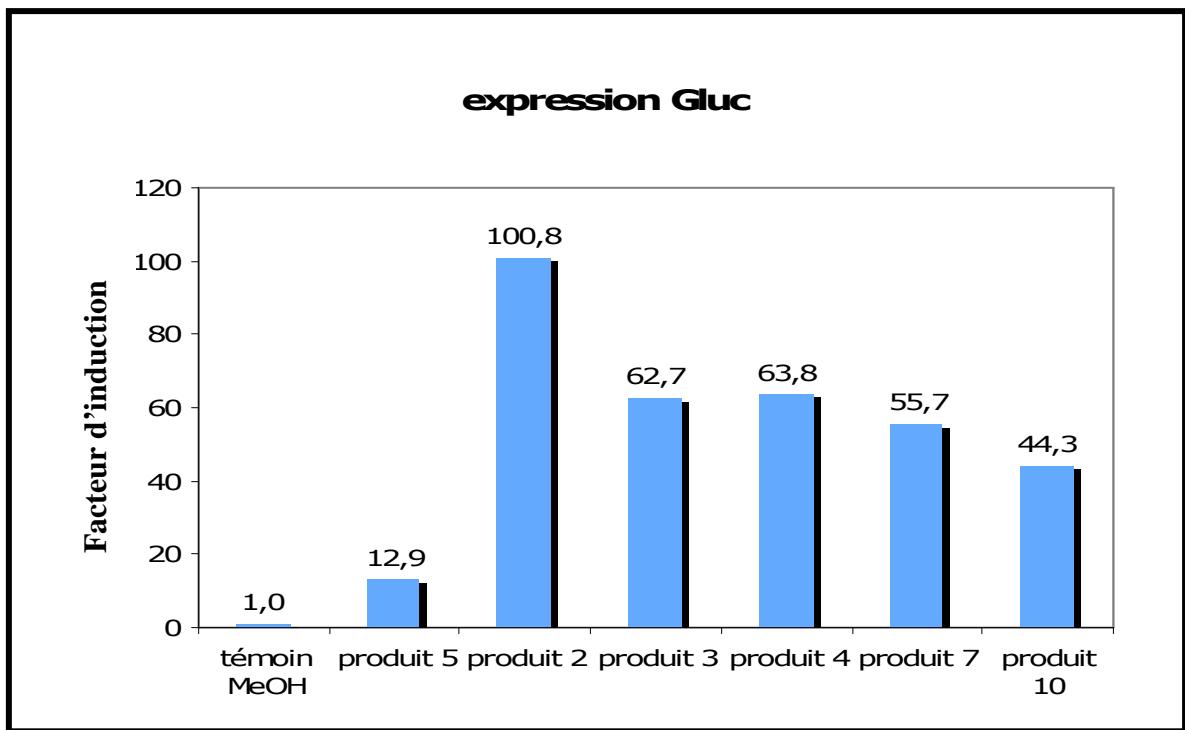
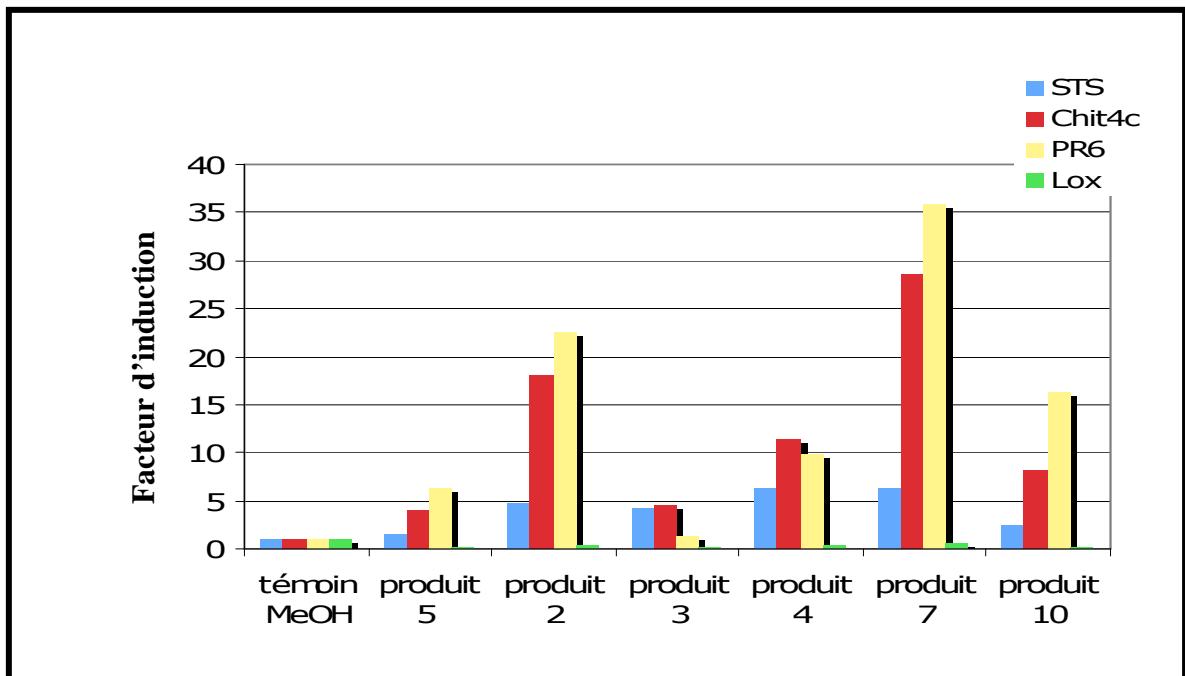


Figure 4: Expression de quelques gènes codant pour des protéines PR chez la vigne par des produits sécrétés par *Streptomyces* sp. nov..

CONCLUSION GENERALE

ET

PERSPECTIVES

L'essor des rendements agricoles a été considérable depuis le début du XXème siècle tant dans les quantités récoltées que dans la qualité des productions végétales. Cet essor a été de pair avec l'utilisation croissante de substances chimiques de synthèse, regroupées sous le terme de pesticides, permettant de lutter contre les maladies et les ravageurs qui représentaient au début du siècle et jusqu'à présent un véritable fléau pour les agriculteurs. Cependant, ces pesticides présentent des conséquences néfastes sur la santé humaine, l'environnement,... De plus, les crises successives traversées par l'agriculture ces dernières années (la vache folle, le poulet à la dioxine etc....) ont rendu l'opinion publique très soucieuse et ont ouvert un large débat sur la qualité de l'alimentation et de l'environnement. Il en ressort une réticence quant à l'utilisation massive de pesticides sur les cultures.

Une des méthodes alternatives à l'utilisation des pesticides chimiques est la lutte biologique. Donc l'utilisation des microorganismes bénéfiques (PGPR) présentent un intérêt scientifique et agronomique majeur car ils jouent un rôle important dans le fonctionnement biologique de la rhizosphère, puisqu'ils sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes. Les PGPR offrent donc des possibilités intéressantes pour une agronomie respectueuse de l'environnement.

Les actinomycètes sont des microorganismes PGPR capables de coloniser la rhizosphère grâce à leurs caractères antagonistes et compétitifs vis-à-vis des autres microorganismes du sol. Certains sont connus pour leur production de sidérophores qui permettent de chélater le fer privant ainsi le fer des autres microorganismes (Cao *et al.*, 2005 ; Getha *et al.*, 2005). La production de sidérophores par *S. griseorubiginouse* est efficace dans la lutte contre la fusariose du bananier causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubenese* (Getha *et al.*, 2005). D'autres sont parasites de champignons en produisant des enzymes qui leur permettent de dégrader la paroi des cellules fongiques ; le parasitisme des mycélia de champignons par les actinomycètes a été décrit dans plusieurs travaux (Yuan et Crawford, 1995 ; Kham *et al.*, 1997 ; Tréjo-Estrada *et al.*, 1998 ; El-Tarably *et al.*, 2000 ; Xiao *et al.*, 2002 ; El-Tarably et Sivasithampar, 2006 ; Errakhi *et al.*, 2007 ; Jain et Jain, 2007). Plusieurs enzymes chitinolytiques ont été identifiés chez certaines espèces d'actinomycètes dont *S. antibioticus* (1966), *S. lividens* (Miyashita *et al.*, 1991), *S. lydicus* WYEC108 (Mahadevan et Crawford, 1997), *S. plicatus* (Abd-Allah, 2001) et *S. halsteii* AJ-7 (Joo, 2005).

Les actinomycètes présentent un intérêt scientifique et agronomique majeur comme nous avons constaté au cours du travail réalisé.

La première partie de ce travail a été consacrée à l'isolement et au criblage de souches d'actinomycètes à partir de la rhizosphère de la vigne saine sauvage du Maroc capables d'inhiber la croissance des champignons phytopathogènes. Ainsi, 142 isolats différents morphologiquement ont été isolés. 24 d'isolats (17%) sont actifs vis-à-vis au moins de 4 champignons tests et seulement 9 isolats sélectionnés actifs sur les cinq champignons tests y compris *Botrytis cinerea* l'agent de la pourriture grise de la vigne. Les observations microscopiques des filaments de *B. cinerea* prélevés au niveau de la zone de contact avec les actinomycètes ont montré que ces souches sont capables de provoquer des altérations de la structure du mycélium de *B. cinerea* et par la suite sa dégradation. Les résultats préliminaires de protection des vitroplants de vigne contre l'attaque de *B. cinerea* a été confirmée d'abord sur des feuilles isolées puis sur des vitroplants.

L'ensemble de ces 9 isolats peut constituer de ce fait un stock de microorganismes antagonistes de *B. cinerea* dans le cadre de la lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne.

Une des particularités intéressantes pour le choix d'un agent de lutte biologique PGPR réside dans leur compétence de colonisation de la rhizosphère, des surfaces racinaires, y survivre et proliférer à l'intérieur de la plante pendant une période considérable en présence ou non d'une microflore existante (Whipps, 1997 ; Bloemberg et Lugtenberg, 2001 ; Compant *et al.*, 2005a). Pour cette raison, nous nous sommes intéressés à sélectionner des PGPR présentant une forte compétence rhizosphérique mais également des PGPR pouvant entrer à l'intérieur de leur hôte végétal. Dans cette optique, nous avons vérifié tout d'abord la capacité de ces souches de pousser sur un milieu à base d'extrait de plante de vigne comme seule source nutritionnelle en gardant sur le même milieu leurs pouvoirs antagonistes vis-à-vis de l'agent de la pourriture grise de la vigne (*B. cinerea*).

Les résultats obtenus montrent que les 9 souches cultivent bien ce milieu. Cependant, 5 seulement présentent un pouvoir antagoniste important vis-à-vis *B. cinerea*. Des observations microscopiques des hyphes de ce dernier prélevés au niveau de la zone de confrontation avec les actinomycètes antagonistes montrent des changements remarquables

par rapport au témoin (dégradation partielle ou totale). Ceci a été confirmé par des observations réalisées au microscope à fluorescence en utilisant les colorants vitaux tels que le Red Nile et le Calcofluor. Pour évaluer les compétences rhizosphériques, endophytiques et/ou de protection de ces 5 souches, on a inoculé par des suspensions cellulaires stérilement et sous conditions gnotobiotiques la rhizosphère de vitoplantules de vigne. Nous avons observé que ces 5 souches colonisent les surfaces racinaires, puis pénètrent par les racines et migrent jusqu'aux feuilles. De plus, en présence de ces souches, les plantes ne présentent pas les symptômes de la pourriture grise. La pénétration intra-racinaire des actinomycètes et la ou les protections associées peuvent être corrélées à la sécrétion d'enzymes dégradant les parois cellulaires par ces actinomycètes étudiés. Ainsi, nous avons démontré que 4 de ces 5 souches synthétisent des endoglucanases.

Les résultats importants obtenus par ces 5 souches notamment ; compétences rhizosphériques, colonisation endophytique, croissance et protection de la vigne offrent donc des possibilités intéressantes pour une agronomie respectueuse de l'environnement avec moins ou sans produits phytosanitaires. En effet, une meilleure utilisation de ces populations bactériennes nécessite une meilleure compréhension des mécanismes qui interviennent pour protéger, stimuler la croissance et/ou les défenses de la plante. Ainsi, nous avons évalué la capacité antagonistes de ces 5 souches sélectionnées vis-à-vis d'autres phytopathogènes de la vigne (maladies de bois ESCA) , à produire des molécules stimulant la croissance ou les défenses naturelles des plantes en condition de laboratoire. Par ailleurs, nous avons évalué la capacité de ces souches à stimuler la croissance des plantules de vigne (*Vitis vinifera* L.), en modèle rhizosphérique contrôlé. Les résultats obtenus ont montré que 4 des 5 souches pouvaient stimuler efficacement la croissance des vitro plants de vigne. Ces souches se sont avérés capables de produire des molécules de type acide indole acétique, hormones capables de stimuler la croissance et les mécanismes de défense naturels des plantes. De solubiliser le phosphate minéral en milieu synthétique minimum (SMM) liquide, de produire des sidérophores et chitinases.

La troisième partie de ce travail a été consacrée à l'identification et la caractérisation morphologique, biochimique et moléculaire des 4 souches sélectionnées. La classification des souches a été effectuée selon deux étapes, une étape numérique portant sur les caractéristiques morphologiques et l'analyse chimique des parois cellulaires des actinomycètes. La deuxième est basée sur les caractéristiques moléculaires de ces souches antagonistes.

Les caractéristiques morphologiques et culturelles des antagonistes ont été étudiées par l'utilisation des milieux ISP (International *Streptomyces* Project) (Pridham et Gottlieb, 1948 ; Shirling et Gottlieb, 1966). L'analyse chimique des parois cellulaires a porté sur le dosage des acides aminés selon la méthode décrite par Becker et al. (1964) et des sucres selon la méthode décrite par Lechevalier et Lechevalier, 1980. Les résultats ont montré que les souches contiennent L-DAP et la glycine. D'autre part, l'observation sous microscope électronique à balayage a montré que les souches forment des chaînes de spores en spirale ou dégradées. L'ensemble de ces données indique que les souches antagonistes étudiées appartiennent au genre *Streptomyces*. Par la suite, nous avons procédé à l'identification moléculaire par la technique 16S RNA. Les résultats du séquençage ont montré que la souche SS10 présente un pourcentage de similarité de 99% avec *Streptomyces marokkonensis* nouvelle espèce identifiée récemment par notre laboratoire, la souche SS38 présente un pourcentage de similarité de 99% avec *Streptomyces purpurasoens* et la souche SS40 présente un pourcentage de similarité de 99% avec *Streptomyces* sp. B22.

L'analyse des arbres phylogénétiques a montré que chacune de ces trois souches forme une branche séparée. Ainsi, la comparaison des caractères morphologiques et biochimiques de ces trois souches avec ceux des souches similaires nous a permis de relever des différences remarquables d'où l'idée qu'il s'agit de nouvelles espèces et la nécessité de faire l'hybridation ADN-ADN. Les résultats obtenus en utilisant cette dernière technique ont confirmé que les trois souches antagonistes SS38, SS40 et SS10 correspondent bien à des nouvelles espèces appartenants au genre *Streptomyces*.

L'avant dernière partie de ce travail, a été consacrée à des investigations complémentaires concernant notamment la détermination de la structure moléculaire de/ou des principes actifs élaborés par une des souche retenue (SS38) par Chromatographie de Partage Centrifuge. Par le biais de cette technique, nous avons pu caractériser 6 molécules différentes.

La dernière partie de ce travail a été consacrée à une étude préliminaire de l'effet éliciteur et/ou protecteur de ces produits. Tout d'abord, en étudiant leur effet antagonistes *in vitro* par les tests de confrontation à distance et locale sur boite de pétri en présence de *B. cinerea*, puis par vaporisation des vitroplants de vigne botrytisé ou non. Ensuite, l'étude de l'expression des réponses de défense par RT-PCR quantitative en temps réel. Les résultats

obtenus ont montré que 5 des 6 produits testés montrent un pouvoir antagoniste locale et à distance vis-à-vis de *B. cinerea*. Cet effet est maintenu à l'échelle de la plante. Ainsi, la vaporisation des vitroplants de vigne par ces produits les protège contre la pourriture grise. De plus le produit 10 en présence de la plante montre un effet vis-à-vis de *B. cinerea*. Lors de cette étude, nous avons également mis en évidence, d'après les résultats préliminaires, une induction locale et systémique des gènes *VvGluc*, *VvPR6* et *VvChi4C* codants respectivement pour des protéines P-R2, PR-6 et PR-3.

Cette induction présente donc un intérêt agronomique tout particulier puisqu'on peut la provoquer artificiellement chez les plantes et par la suite pourrait être un moyen de limiter les apports de pesticides dans les champs pour une agriculture durable plus respectueuse de l'environnement et de la santé humaine.

Perspectives

Au terme de ce travail, nous envisageons de continuer nos recherches sur certains axes pertinents relatifs aux Actinomycètes PGPR et qui méritent d'être étudiés:

- ❖ Tester l'efficacité des souches sélectionnées sur des boutures fructifières, en serre et en plein champ, en utilisant des marqueurs moléculaires comme par exemple le gène *gfp* (pour “Green Fluorescent Protein”) codant la protéine verte fluorescente ou ses dérivés *egfp*, *cgfp* et *ygfp* ou à des marqueurs chromogéniques comme le gène *gusA* codant la protéine GUS ou β -glucuronidase conférant une coloration bleue à la bactérie après ajout d'un substrat afin de pouvoir les visualiser et les différencier de la microflore existante.
- ❖ Optimiser les conditions d'extractions et de purifications à grande échelle des molécules caractérisées pour une utilisation en plein champ.
- ❖ Purification et élucidation structurale des autres substances élaborées par les deux autres souches sélectionnées (Collaboration avec le laboratoire de pharmacognosie de l'Université de Reims Champagne Ardenne).
- ❖ Etudier, de façon plus approfondie les gènes de défenses induits chez la vigne en présence d'actinomycète ou leurs produits.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Ait Barka E., Belarbi A., Hachet C., Nowak J. and Audran J.C.** (2000) Enhancement of *in vitro* growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. FEMS Microbiology Letters 186: 91-95.
- Ait Barka E., Eullafroy P., Clément C. and Vernet G.** (2004) Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. Plant Cell Reports 22: 608-614.
- Ait Barka E., Gognies S., Nowak J., Audran J.C. and Belarbi A.** (2002) Inhibitory effect of bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. Biological Control 24: 135-142.
- Aziz A., Trotel-Aziz P., Dhuicq L., Jeandet P., Couderchet M. and Vernet G.** (2006) Chitosans oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. Phytopathology 96: 1188-1194.
- Aziz A., Poinsot B., Daire X., Adrian M., Bézier A., Lambert B., Joubert J.M. and Pugin A.** (2003) Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. Molecular Plant-Microbe Interactions 16: 1118-1128.
- Baillieul F.** (2007) Elicitor and resistance-inducing activities of beta-1,4 celldextrins in grapevine, comparison with beta-1,3 glucans and alpha-1,4 oligogalacturonides. Journal of Experimental Botany 58: 1463-1472.
- Baker B., Zambryski P., Staskawicz B. and Dinesh-Kumar S.P.** (1997) Signaling in plant-microbe interactions. Science 276: 726-733.
- Bashan Y., Levanony H.** (1991) Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasiliense*. Plant Soil 137, 99–103.
- Bashan Y. and de-Bashan L.E. (2005)** Plant growth-promoting bacteria. In: Encyclopedia of Soils in the Environment (Hillel D., ed), Elsevier, Oxford, United Kingdom, pp. 103-115.
- Bationo A., Mokwunye A.U.** (1991) Alleviating soil fertility constraints to increased crop production in west Africa : the experience in the Sahel. Fertilizer Research 29, 95-115.
- Bell C.R., Dickie G.A., Harvey W.L.G. and Chan J.W.Y.F.** (1995) Endophytic bacteria in grapevine. Canadian Journal of Microbiology 41: 46-53.
- Benhamou N., Belanger R.R. and Paulitz T.C.** (1996a) Induction of differential host responses by *Pseudomonas fluorescens* in Ri T-DNA-transformed pea roots after challenge with *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* and *Pythium ultimum*. Phytopathology 86: 114-178.

- Benhamou N., Kloepper J.W., Quadt-Hallmann A. and Tuzun S.** (1996b) Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiology* 112: 919-929.
- Benhamou N., Kloepper J.W. and Tuzun S.** (1998) Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta* 204: 153-168.
- Benhamou N., Gagné S., Le Quéré D. and Dehbi L.** (2000) Bacterial-mediated induced resistance in cucumber : beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 90: 45-56.
- Benhamou N.** (2006) Ultrastructural studies in plant disease resistance. In: *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants* (Tuzun S. and Bent E., eds), Springer Science+Business Media, New York, United States of America, pp. 49-82.
- Benizri E., Baudoin E. and Guckert A.** (2001) Root colonization by inoculated plantgrowth rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology* 11: 557-574.
- Bisson J.** (2001) In Vignes et raisins en France, diversité et utilisations, Editions Féret, Bordeaux, France, 160 p.
- Bugaret Y.** (2002) <http://www.inra.fr/hyp3>
- Bulit J., Dubos B.** (1981) Epidemiologie de la pourriture grise. Compte rendu du Symposium International consacré à la pourriture grise, Colmar, France, 210-213.
- Cao L., Qiu Z., You J., Tan H., Zhou, S.** (2004) Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Lett. Appl. Microbiol.* 39: 425-430.
- Cao L., Qiu Z., You J., Tan H., Zhou S.** (2005) Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of Fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiol. Lett.* 247 : 147-152.
- Cavaglieri L., Orlando J., Rodriguez M.I., Chulze S. and Etcheverry M.** (2005) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the maize root level. *Res. Microbiol.* 156(5-6):748-754.
- Chanway C.P., Shishido M., Nairn J., Jungwirth S., Markham J., Xiao G. and Holl F.B.** (2000) Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Forest Ecology Management* 133: 81-88.

- Chen W.M., Moulin L., Bontemps C., Vandamme P., Béna G. and Boivin-Masson C.** (2003) Legume symbiotic nitrogen fixation by β -Proteobacteria is widespread in nature. *Journal of Bacteriology* 185: 7266-7272.
- Chen W.M., James E.K., Chou J.H., Sheu S.Y., Yang S.Z. and Sprent J.I.** (2005) β -rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan. *New Phytologist* 168: 661-675.
- Chen W.M., James E.K., Coenye T., Chou J.-H., Barrios E., de Faria S.M., Elliott G.N., Sheu S.-Y., Sprent J.I. and Vandamme P.** (2006) *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 1847-1851.
- Cheng X. and Baumgartner K.** (2004) Arbuscular mycorrhizal fungi-mediated nitrogen transfer from vineyard cover crops to grapevines. *Biology and Fertility of Soils* 40: 406-412.
- Cheng X. and Baumgartner K.** (2006) Effects of mycorrhizal roots and extraradical hyphae on N uptake from vineyard cover crop litter and the soil microbial community. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 2665-2675
- Chester K.** (1933) The problem of acquired physiological immunity in plants. *Quarterly Review of Biology* 8: 129-154.
- Chet I. & Inbar J.** (1994) Biological control of fungal pathogens. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 48: 37-43.
- Chi F., Shen S.H., Cheng H.P., Jing Y.X., Yanni Y.G. and Dazzo F.B.** (2005) Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 7271-7278.
- Cocking E.C.** (2003) Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and Soil* 252: 169-175.
- Complant S.** (2002) Caractérisation et comparaison de l'efficacité de biofungicides systémiques à base de chitosan sur le contrôle du champignon phytopathogène *Botrytis cinerea* chez la vigne *Vitis vinifera* L. Diplôme d'Etudes Approfondies, Compiègne, France, pp. 1-45.
- Conn V.M., Walker A.R., Franco C.M.M.** (2008) Endophytic actinobacteria induce defence pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact* 21, 208-218.
- Coombs J.T., Franco C.M.** (2003) Isolation and identification of actinobacteria from surface sterilized wheat roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5603-5608.
- Cook R.J.** (1993) Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 53–80.

Côté F. and Hahn M.G. (1994) Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Molecular Biology* 26: 1379-1411.

Côté F., Ham K.-S., Hahn M.G. and Bergmann C.W. (1998) Oligosaccharide elicitors in host-pathogen interactions. In: *Generation, Perception, and Signal Transduction, Subcellular Biochemistry* (Biswas B.B. and Das H., eds), Plenum Press, New York, United States of America, pp. 385-432.

Davis P.J. (2004) Plant hormones biosynthesis, signal transduction, action! In: Davies P.J., ed, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-751.

De Lorenzo M.E., Scott G.I., Ross P.E. (2001) Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. *Environmental Toxicology & Chemistry* 20(1): 84-98.

Dunne C., Delany I., Fenton A. & O'gara F. (1996) Mécanismes involvés dans le biocontrôle par les microorganismes. *Agronomie*. 16: 721-729.

Duijff B.J., Pouhair D., Olivain C., Alabouvette C. and Lemanceau P. (1998) Implication of systemic induced resistance in the suppression of Fusarium wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *European Journal of Plant Pathology* 104: 903-910.

Dutruc-Rosset G. (2001) Extrait du rapport sur la vitiviniculture mondiale, 26ème Congrès, Adélaïde, Australie. Lettre de l'Office International de la Vigne & du Vin: 1-4.

Ebel J. and Costo E.G. (1994) Elicitors of plant defense responses. *International Review of Cytology* 148: 1-36.

Elbeltagy A., Nishioka K., Sato T., Suzuki H., Ye B., Hamada T., Isawa T., Mitsui H. and Minamisawa K. (2001) Endophytic colonization and *in planta* nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5285-5293.

El-Tarably K.A., Sykes M.L., Kurtböke I.D., Hardy Gest J., Barbosa AM., Dekker R.F.H. (1996) Synergistic effects of a cellulase-producing *Micromonospora carbonacea* and an antibiotic-producing *Streptomyces violascens* on the suppression of *Phytophthora cinnamomi* root rot of *Banksia grandis*. *Canadian Journal of Botany* 74, 618-624.

Esterio M., Auger J., Drogue A., Flanagan S. and Campos F. (2000) Efficacy of *Bacillus subtilis* (Ehrenberg), Cohn, QST-713 Strain (SerenadeTM), on *Botrytis cinerea* control in table grape (*Vitis vinifera* L. cv Thomson Seedless). In: *Proceedings of the XII International Botrytis Symposium*, Reims, France, Abstract L27.

- Esquerre-Tugayé M.T., Boudart G. & Dumas B.** (2000) Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens. *Plant Physiology & Biochemistry* 38 (1&2): 157-163.
- Felbrich G., Romanski A., Varet A., Blume B., Brunner F., Engelhardt S., Felix G., Kemmerling B., Krzymowska M. and Nürnberger T.** (2002) NPP1, a Phytophthora associated trigger of plant defense in parsley and Arabidopsis. *The Plant Journal* 32: 375-390.
- Felix G., Duran J.D., Volko S. and Boller T.** (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal* 18: 265-276.
- Fiedler H.P., Krastel P., Muller J., Gebhardt K., Zeeck A.** (2001) Enterobactin: the characteristic catecholate siderophore of Enterobacteriaceae is produced by Streptomyces species. *FEMS Microbiology Letters* 196, 147-151.
- Filion M., St-Arnaud M., Fortin J.A.** (1999) Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices and different rhizosphere microorganisms. *New Phytol.* 141, 525–533.
- Glick B.R., Penrose D.M., Li J.** (1998) A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* 190, 63–68.
- Gamalero E., Lingua G., Berta G. and P. Lemanceau** (2003) Methods for studying root colonization by introduced beneficial bacteria. *Agronomie* 23: 407-418.
- Goes da Silva F., Iandolino A., Al-Kayal F., Bohlmann M.C., Cushman M.A., Lim H., Ergul A., Figueroa R., Kabuloglu E.K., Osborne C., Rowe J., Tattersall E., Leslie A., Xu J., Baek J.M., Cramer G.R., Cushman J.C. and Cook D.R.** (2005) Characterizing the grape transcriptome. Analysis of expressed sequence tags from multiple *Vitis* species and development of a compendium of gene expression during berry development. *Plant Physiology* 139: 574-597.
- Gyaneshwar P., Kumar G.N., Parekh L.J., Poole P.S.** (2002) Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil.* 245, 83-93.
- Hamiduzzaman M.M., Jakab G., Barnavon L., Neuhaus J.M. and Mauch-Mani B.** (2005) β -Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 819-829.
- Hatzidimitriou E., Bouchilloux P., Darriet P., Bugaret Y., Clerjeau M., Poupot C., Medina B. & Dubourdieu D.** (1996) Effect of antifungal protection of grapevines using a cupric formulation on the level of maturity of grapes and the varietal aroma of Sauvignon

wines (results of a three year study). Journal International des Sciences de la Vigne & du Vin 30(3): 133-150.

Herms S., Seehaus., Koehle H. & Conrath U. (2002) A strobilurin fungicide enhances the resistance of tobacco against tobacco mosaic virus and *Pseudomonas syringae* pv tabaci. Plant Physiology 13: 120-127.

Hess F.D. (1993) Herbicide effects on plant structure, physiology, and biochemistry. In Pesticide interactions in crop protection, Hess FD (Ed), CRC Press, Boca Raton, Floride, Etats-Unis, 13-34.

Hinsinger P. (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root induced chemical changes: a review. Plant Soil 237, 173-195.

Hinsinger P., Gilkes R.J. (1997) Dissolution of phosphate rock in the rhizosphere of five plant species grown in an acid, P-fixing substrate. Geoderma 75, 231-249.

Hoffland E., Hakulinen J. and van Pelt J.A. (1996) Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. Phytopathology 86: 757-762.

Hoffland E., Pieterse C.M.J., Bik L. and van Pelt J.A. (1995) Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology 46: 309-320.

Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Stanley J.T. (1994) Williams, S.T. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology (9th Ed.) Baltimore, Williams & Wilkins.

Huglin P. (1986) In Biologie et écologie de la vigne. Payot Lausanne, Suisse, 372 p.

Humphris S.N., Bengough A.G., Griffiths B.S., Kilham K., Rodger S., Stubbs V., Valentine T.A. and Young I.M. (2005) Root cap influences root colonisation by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 on maize. FEMS Microbiology Ecology 54: 123-130.

Itoh M. & Manabe K. (1997) Effect of leaching of a soil-applied herbicide, diuron, on its phytotoxicity in grape and peach. Journal of Japanese Society for Horticultural Science 66(2): 221-228.

Jackson T.J., Burgess T., Colquhoun I. & Hardy G.E. (2000) Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophtora cinnamomi*. Plant Phathology 49: 147-154.

Kado C.I. (1992) Plant pathogenic bacteria. In: The Prokaryotes, vol. I. (Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., and Schleifer K.-H., eds), Springer-Verlag, New York, United States of America, pp. 659-674.

- Kobayashi D.Y. and Palumbo J.D.** (2000) Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: Microbial Endophytes (Bacon C.W. and White J.F., eds), Marcel Dekker Incorporated, New York, United States of America, pp. 199-233.
- Krassilnikov N.A.** (1938) The phenomenon of autolysis in Actinomycetales. *Microbiology* 7, 708-720.
- Krasilnikov M.** (1961) On the role of soil bacteria in plant nutrition. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 7, 128-144.
- Nair M.G., Putnam A.R., Mishra S.K., Mulks M.H., Taft W.H., Keller J.E., Miller J.R., Zhu P.P., Meinhart J.D., Lynn D.G.** (1989) Faeriefungin: A new broad-spectrum antibiotic from *Streptomyces griseus* var. *autotrophicus*. *J. Nat. Prod.* 52, 797-809.
- van Wees S., Pieterse C., Trijsseenaar A., Van't Westende Y., Hartog F. and van Loon L.C.** (1997) Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10: 716-724.
- van Wees S.C.M., Luijendijk M., Smoorenburg I., van Loon L.C. and Pieterse C.M.J.** (1999) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes, but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene Atvsp upon challenge. *Plant Molecular Biology* 41: 537-549.

ANNEXES