



UNIVERSITE IBN ZOHR

CENTRE DES ETUDES DOCTORALES IBN ZOHR

Formation Doctorale Sciences de la Vie et Ressources Naturelles

Etablissement : Faculté des Sciences

THESE

Présentée par

DIHAZI Abdelhi

pour l'obtention du grade de

DOCTORAT NATIONAL

Spécialité : Biotechnologies et physiologies végétales



**Interaction Palmier dattier-*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* :
Induction des réactions de défense par l'acide salicylique et rôle de
quelques microorganismes antagonistes de l'agent pathogène dans le
contrôle de la maladie du Bayoud**

SOUTENUE LE 09 Novembre 2012

Devant la commission d'examen composée de :

Mme Lalla Mina IDRISI HASSANI, professeur à la FSA, Présidente et rapporteur/examinateur ;

M. Yeder OUHDOUCH, professeur à la FSSM, rapporteur/examinateur ;

M. Ahmed QADDOURY, professeur à la FSTM, rapporteur ;

M. Mohamed BAAZIZ, professeur à la FSSM, co-directeur de thèse ;

M. Mohammed Amine SERGHINI, professeur à la FSA, directeur de thèse ;

M. Azeddine DRIOUCH, professeur à la Faculté des Sciences, Université de Rouen, France, invité.

Universite Ibn Zohr
Centre des Etudes Doctorales
Faculté des sciences Agadir

FICHE PRESENTATIVE DE LA THESE

- Nom et Prénom : **DIHAZI Abdelhi**
- Intitulé du travail : **Interaction Palmier dattier-*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* : Induction des réactions de défense par l'acide salicylique et rôle de quelques microorganismes antagonistes de l'agent pathogène dans le contrôle de la maladie du Bayoud.**
- Encadrants : **Professeurs Mohammed Amine Serghini, Ismail El Hadrami & Mohamed Baaziz**
- Laboratoire et institution : Laboratoire de Biotechnologie et de Valorisation des Ressources Naturelles, Faculté des Sciences Agadir.
- Lieux de réalisation du travail :
 - * Laboratoire de Biotechnologie et de Valorisation des Ressources Naturelles, Faculté des Sciences Agadir,
 - * Laboratoire de Biotechnologie, Biochimies, Valorisation et Protection des Plantes, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech,
 - * Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale, Université de Rouen, France.
- Période de réalisation du travail de la thèse : 2002- 2012.
- Rapporteurs autres que l'encadrant :
 - * Lala Mina Idrissi Hassani, Professeur, Directrice du Centre des études doctorales Universite IBN ZOHR Agadir,
 - *Qaddoury Ahmed, Professeur, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences et Techniques Marrakech,
 - * Ouhdouch Yedir, Professeur, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia Marrakech.
- Cadres de coopération :

- Coopération Franco-Marocaine PRAD 11-05 et 02-06
- Action Intégrée Maroc-Tunisie (24/02)
- Action Intégrée France-Maroc (01/23)
- Protars II P51/14

- Ce travail a donné lieu aux résultats suivants :

- Publications

- **Dihazi A.**, Jaiti F., Taktak W., kilani-Feki O., Jaoua S., Driouich A., Baaziz M., Daayf F., Serghini M. A. Use of two bacteria for biological control of bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* in date palm (*Phoenix dactylifera* L) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 55 (2012) 7-15.
- **Dihazi A** Serghini., M. A., Jaiti F., Daayf F., Driouich A., Dihazi H. and El Hadrami I. Structural and Biochemical Changes in Salicylic-Acid-Treated Date Palm Roots Challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Journal of pathogens* (2011) Volume 2011, Article ID 280481, 9 pages.
- **Dihazi A**, J'aity F., Zouine J., El Hassni M., and El Hadrami I. Effect of salicylic acid on phenolic compounds related to date palm resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Phytopathologia Mediterranea* (42), 9 – 16, 2003.
- **Dihazi Abdelhi**, Serghini Mohammed Amine, El Hadrami Abdelbasset, Jaiti Fatima, Daayf Fouad, Dihazi Hassan and Ismail El Hadrami: *Phoenix dactylifera* L.-*Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* interaction: potentiation of induced disease resistance by salicylic acid (en cours).
- Abohatem M., Chakrafi F., Jaiti F., **Dihazi A.** and M. Baaziz. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Limit Incidence of *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* on Date Palm Seedlings by Increasing Nutrient Contents, Total Phenols and Peroxidase Activities. *The Open Horticulture Journal*, 2011, 4, 10-16.
- El Hassni M., J'aity F., **Dihazi A.**, Ait Barka E., Daayf F., and El Hadrami I: Enhancement of defense responses against Bayoud disease by treatment of date palm seedling with an hypoaggressive *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* isolate. *Journal of Phytopathology* 152 (3), 182 – 189 , 2004.
- Jaity F., **Dihazi A.**, El Hadrami A., El Hassni M. and El Hadrami I. Effect of exogenous application of jasmonic acid on date palm defence reaction against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Phytopathol Mediterr* (2004) 43:325-331.

Communications

- *Communications orales*

- **Dihazi A.**, M. A. Serghini et El Hadrami I. Effet de l'acide salicylique et de l'inoculation par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* sur les composés phénoliques et l'activité phénylalanine ammonia-lyase des racines du Palmier dattier. Symposium International sur les composés phénoliques « Neutraceutiques ou medicaments », Agadir, 17-18 Décembre **2009**.

- *Communications affichées*

- **Dihazi A. and El Hadrami I.** Changes in peroxidases and phenylalanine ammonia-lyase activities in date palm seedlings treated by salicylic acid and inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. XXIVth International Conference on Polyphenols, volume 1: 385-386, Salamanca (Spain) 8-11 July, **2008**.
- **Dihazi A.**, Taktak W., kilani Feki O., Jaiti F., Serghini M. A., Jaoua S. and El Hadrami I.: Biocontrol of Date palm pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, using three bacteria isolated from soil. 13th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, volume 2: 571-572, Rome (Italy) 20-25 june, **2010**.
- **Dihazi A.**, Taktak W., kilani Feki O., Jaiti F., Serghini M. A., Jaoua S. and El Hadrami I.: About some microorganisms inhibiting the causal agent of Bayoud disease in date palm. XXVth International Conference on Polyphénols, volume 1: 279-280, Montpellier (France) 24-27 August **2010**.

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier le Président de l'Université Ibn Zohr, le Doyen de la Faculté des Sciences d'Agadir et la Directrice du Centre des Etudes Doctorales pour leur encouragement de la recherche scientifique.

Je tiens à remercier également les membres du Jury, Professeur Lala Mina Idrissi Hassani, Professeur Qaddoury Ahmed et Professeur Ouhdouch Yedir, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Un grand merci au Professeur Mohammed Amine Serghini, mon directeur de thèse pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour avoir cru en moi. Vos encouragements, vos suggestions, et votre aide précieuse m'ont beaucoup guidé à mener à terme ce travail de recherche.

Un grand merci au défend Ismaïl El Hadrami, mon coencadrant, tu as été pour mois un exemple, de dynamisme, de dévouement, de compétence et de sagesse. Ismaïl, toute ma reconnaissance et ma gratitude pour la période que nous avons passé ensemble à chercher des solutions aux problèmes que nous avons rencontrés.

Je remercie également le Professeur Mohamed Baaziz, Directeur du Laboratoire de Biotechnologie, Biochimies, Valorisation et Protection des Plantes, qui a accepté, malgré ses nombreuses préoccupations, d'assumer l'encadrement des étudiants du défend Ismail El Hadrami.

Mes vifs remerciements vont au Professeur Fouad Daayf du Département des Sciences des Plantes, Université de Manitoba, Canada, vos conseils, vos corrections, votre soutien bienveillant m'ont été d'un grand support pour mener à bien mes travaux de recherche. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je voudrais remercier également le Professeur Azeddine Driouch, Directeur-adjoint du laboratoire GLYCO-MEV, Faculté des Sciences, Université de Rouen, France, d'avoir bien voulu m'accueillir au sein de son équipe et de m'encadrer durant mon stage au laboratoire GLYCO-MEV. Vous m'avez fait découvrir le monde des cellules bordantes. Merci encore une fois de plus pour avoir accepté de participer à l'évaluation de ce travail.

Je tiens à remercier le Professeur Khalid Naamani, responsable de l'équipe du Laboratoire de Biotechnologie, Biochimies, Valorisation et Protection des Plantes. Vous étiez là lorsque nous avons eu le plus besoin de soutien et d'encouragements.

Un remerciement particulier à Monsieur Mustapha Ait Chitt Directeur du Domaine agricole Al Bassatine pour la confiance qu'il a fait dans nos résultats et pour les vitroplants de haute qualité qu'il a mis à notre disposition pour qu'on puisse tester nos résultats dans des terrains infectés par la maladie du Bayoud.

Que le Professeur Sylvie Chevalier Laurence, Laboratoire de Microbiologie Signaux et MicroEnvironnement, Université de Rouen, France, trouve ici ma reconnaissance pour sa contribution dans mes travaux de recherche. Merci pour avoir identifié, à deux reprises, la

bactérie Cp2Co5. Merci encore une fois de plus pour avoir accepté de participer à l'évaluation de ce travail.

Merci à mes collègues du Laboratoire de Biotechnologie, Biochimies, Valorisation et Protection des Plantes de la FSSM qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à enrichir ce travail de recherche, en particulier Fatima Jaiti et Jamila Zouine. Merci également aux stagiaires qui nous ont donné un coup de main précieux durant la réalisation de cette thèse, merci à Wafa Taktak à Sana NACIRI et à Fadoua CHAKRAFI.

Merci également au Professeur Samir Jaoua, Université de Qatar, et au Professeur Olfa KELANI-FEKI, Laboratoire des Biopesticides, Centre de Biotechnologies de Sfax, Tunisie pour la confiance qu'ils nous ont faite en mettant à notre disposition des bactéries endophytes à tester contre le Fusarium agent de la maladie du Bayoud.

Je tiens à remercier de manière distinguée mon frère le Professeur Hassan DIHAZI, Laboratoire de Protéomie Clinique, Université Göettingen, Allemagne, pour son soutien et ses encouragements et pour le matériel scientifique qu'il a apporté à la Faculté des Sciences de Marrakech.

Mes remerciements vont aussi à ma famille, à ma femme et ma mère à mes enfants et à mes frères et sœurs. Vous étiez toujours à mes côtés, vous m'avez encouragé et soutenu, sans vous je n'aurais jamais pu mener cette aventure à terme.

Pour terminer je voudrai remercier Dieu pour l'aide qu'il m'a apporté durant la réalisation de ce travail.

Dédicaces

A mes chers parents, Mu Zineb Et Ba Si Brahim

A mes frères et sœurs

A ma femme Fatiha

*A mes enfants Zineb, Merieme, Soulaymane et
Imrane*

A mes amis

Abréviations

- Ag** : *Bacillus amyloliquefaciens* strain Ag1
- Avr** : Avirulence
- BSTN** : Bousthami noir
- Cs** : *Burkholderia cepacia* strain Cs5
- MDA** : Malonyldialdehyde
- ET** : Ethylène
- Foa** : *Fusarium oxysporum* sp. *albedinis*
- HPLC** : Chromatographie Liquide à Haute Performance
- HR** : Réaction hypersensible
- ISR** : Résistance systémique induite
- JA** : Acide jasmonique
- JHL** : Jihel
- NPR1** : Non expressor of PR genes 1
- PAL** : Phenylalanine ammonia-lyase
- PAMPs** : Pathogen Associated Molecular Pattern
- PBS**: Tampon Phosphate Salin
- PDA** : Potato-Dextrose Agar
- PDB** : Potato-Dextrose Broth
- PGPRs** : Plant Growth Promoting Rhizobacteria
- PIPES** : 1,4-piperazinediethanesulfonic acid
- PR-protéines** : Pathogens related protéines
- R** : Résistance
- ROS** : espèces réactives de l'oxygène
- SA** : Acide salicylique
- SAR** : Résistance systémique acquise

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES	
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
<i>Figure 1: Symptômes de la maladie de Bayoud</i>	4
<i>Figure 2: <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> (Foa), en milieu PDA</i>	6
<i>Figure 3 : Spores du <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> sous microscope optique</i>	6
<i>Figure 4 : Les isomères de position de l'acide cafféoylshikimique.....</i>	10
<i>Figure 5 : Les acides hydroxycinnamiques :</i>	10
<i>Figure 6: Schéma simplifié des principales étapes des réactions de défense élaborées par la plante suite à l'infection par un pathogène</i>	14
<i>Figure 7: Représentation schématique de la relation gène pour gène.....</i>	17
<i>Figure 8: Structure des différentes classes des protéines codées par les gènes R chez les plantes.....</i>	17
<i>Figure 9: Mécanismes de reconnaissance plante-pathogène: modèle de garde</i>	21
<i>Figure 10: Sources et fonctions des ROS chez les plantes suite à l'infection par des agents pathogènes</i>	23
<i>Figure 11: Représentation simplifiée des voies de biosynthèse de l'acide salicylique.....</i>	25
<i>Figure 12: Les composantes majeures des voies de défense dépendantes du SA</i>	27
<i>Figure 13: Voies de transduction impliquées dans la résistance systémique induite par un pathogène (SAR) et par une rhizobactéries (ISR).....</i>	31
<i>Figure 14 : Structure de la paroi primaire des cellules végétales.....</i>	34
<i>Figure 15 : Quelques phytoalexines de nature phénoliques.....</i>	37
<i>Figure 16: Rôles des peroxydases dans les réactions de défense des plantes.....</i>	42
MATERIEL ET METHODES	
<i>Figure 1 : Plantules du cultivar Jihel de palmier dattier âgées de 6 mois (2 à 3 feuilles).....</i>	43
<i>Figure 2a : culture du <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> dans le milieu PDA.....</i>	44
<i>Figure 2b : les conidies du <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> sous microscope optique.....</i>	44
<i>Figure 3a : Co-culture de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> (Foa) et des bactéries (B) antagonistes en milieu PDA</i>	46
<i>Figure 3b : <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> en milieu PDA.....</i>	46
<i>Figure 4 : Effet du surnageant (SN) des bactéries sur la culture du Foa.....</i>	46
<i>Figure 5 : plantules de palmier dattier trempées dans des solutions d'acide salicyliques.....</i>	48
<i>Figure 6 : zone d'injection du <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>.....</i>	48
<i>Figure 7 : Protocole d'extraction des composés phénoliques solubles (en rouge) et pariétaux (en bleu) des racines du palmier dattier.....</i>	51
RESULTATS	
Publication 1	
<i>Figure 1: Time-course of changes in the content of free phenolics in roots of date palm cv. Jihel in response to different SA concentrations.....</i>	63
<i>Figure 2: Time-course of changes in the content of free phenolics in roots of date palm cv. Bousthami noir in response to different SA concentrations.....</i>	63
<i>Figure 3: Effect of SA treatment (50 µM) on soluble phenolic contents in roots of date palm cv. Jihel (JHL) and cv. Bousthami noir (BSTM) one month after inoculation with <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i></i>	65
<i>Figure 4: Effect of SA treatment (50 µM) on cell wall phenolics in roots of date palm cv. Bousthami noir (BSTM) and cv. Jihel (JHL) one month after inoculation with <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i></i>	65
<i>Figure 5: Typical HPLC profiles obtained with three wave length (280 nm, 320 nm and 350 nm) of phenolics in root extracts of date palm before (left) and after (right) inoculation with <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i></i>	66
Publication 2	
<i>Figure 1: Time-course of H₂O₂ contents in roots of date palm cv Jihel in response to salicylic acid treatment (100 µM) and inoculation with <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>albedinis</i> (Foa) at the 6th day.....</i>	79
<i>Figure 2: Time-course of malonyldialdehyde (MDA) contents in roots of date palm cv. Jihel in response to treatment by salicylic acid (100 µM) and inoculation with <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>albedinis</i> (Foa) at the 6th day.....</i>	79
<i>Figure 3: Activity of peroxidases in roots of date palm cv. Jihel in response to treatment by salicylic acid (100 µM) and inoculation with <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>albedinis</i> (Foa) at the 6th day</i>	81
<i>Figure 4: SDS-PAGE of guaiacol peroxidase in roots of date palm cv. Jihel in reponse to treatment by salicylic acid (100 µM) and inoculation with <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>albedinis</i> (Foa) at the 6th day.....</i>	81
<i>Figure 5: Activity of catalase in roots of date palm cv. Jihel in response to treatment by salicylic acid (100 µM) and inoculation with <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>albedinis</i> (Foa) at the 6th day.....</i>	81

μM) and inoculation with <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>albedinis</i> (Foa) at the 6 th day.....	83
<i>Figure 6:</i> Activity of phenylalanine ammonia-lyase in roots of date palm cv. Jihel in response to treatment by salicylic acid (100 μM) and inoculation with <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>albedinis</i> (Foa) at the 6 th day.....	83
Publication 3	
<i>Figure 1:</i> Without SA treatments, diseased control plants showed progressing wet necrosis of the roots (b). In contrast, after SA treatment, plants developed limited necrotic lesions (a).....	96
<i>Figure 2:</i> Light micrographs of samples from JHL date palm root tissues inoculated by <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> (Foa).....	96
<i>Figure 3:</i> Cytochemical localization of peroxidase activity in date palm root tissues of JHL cultivar revealed by brown deposits after DAB staining.....	98
<i>Figure 4:</i> SDS-PAGE of peroxidase activity in roots of date palm Jihel cultivar visualized using DAB staining in reponse to treatment by salicylic acid (100 μM) and inoculation with <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> at the 15 th day after inoculation.....	98
<i>Figure 5:</i> Histochemical localization of caffeic acid derivatives and flavonoids in date palm root tissues stained with Neu's reagent under Blue light	99
<i>Figure 6:</i> Transmission electron micrographs of date palm root tissues treated with SA and infected by <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> (Foa).....	101
Publication 4	
<i>Figure 1:</i> Inhibition of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> -growth in PDA medium in co-culture with <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Ag) and with <i>Burkholderia cepacia</i> (Cs)	116
<i>Figure 2:</i> Inhibition of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> -sporulation in PDB medium in co-culture with <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Ag) and with <i>Burkholderia cepacia</i> (Cs).....	116
<i>Figure 3:</i> Inhibition of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> -growth with the supernatant of <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Sn Ag) and with the supernatant of <i>Burkholderia cepacia</i> (Sn Cs).....	117
<i>Figure 4:</i> Cytological alterations into the <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> (Foa) mycelium.....	117
<i>Figure 5:</i> Size of browning zone of date palm roots inoculated with <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> (Foa).....	117
<i>Figure 6:</i> Browning zone of date palm roots inoculated with <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	117
<i>Figure 7:</i> Specific activity of peroxidase in date palm roots treated with the bacteria and inoculated with <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	119
<i>Figure 8:</i> Active staining of peroxidase isoforms in date palm roots inoculated by the bacteria before being inoculated by <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	119
<i>Figure 9:</i> Soluble phenolic content of JHL-date palm roots injected by the bacteria and inoculated with <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	119
<i>Figure 10:</i> HPLC profils of solubles phenolic compounds of JHL-date palm roots.....	121
<i>Figure 11:</i> HPLC profils of solubles phenolic compounds of JHL-date palm roots.....	121
RESULTATS NON PUBLIES	
Partie I	
<i>Figure 1 :</i> Cellules bordantes de la pointe racinaire du palmier dattier.....	132
<i>Figure 2 :</i> Cellules bordantes de la pointe racinaire du palmier dattier.....	133
<i>Figure 3 :</i> Révélation des molécules pariétales par immunohistochimie au niveau des « cellules bordantes » du palmier dattier.....	134
<i>Figure 4 :</i> Immunohistolocalisation du xylogalacturonane au niveau des cellules bordantes par l'anticorps LM8 sans aucun traitement (a) et après 5 jours de traitement par l'extrait fusarique (b).	135
<i>Figure 5 :</i> Immunohistolocalisation du xyloglucane au niveau des cellules bordantes du palmier dattier marquées par l'anticorps LM 15 sans aucun traitement (a) et après 10 jours de traitement par l'extrait fusarique (b).	135
<i>Figure 6:</i> Révélation de quelques molécules pariétales au niveau des racines du palmier dattier par immunohistochimie	136
<i>Figure 7 :</i> Immunohistolocalisation des Xyloglucanes au niveau des racines du palmier dattier (variété JHL) par l'anticorps LM 15 avant (a) et après infection (b) par Foa.....	137
<i>Figure 8:</i> Immunohistolocalisation des Xylogalacturonanes au niveau des racines du palmier dattier (variété JHL) (marquage par l'anticorps LM8) avant (a) et après (b) infection par Foa.....	137
<i>Figure 9:</i> Immunohistolocalisation des arabinogalactanes protéines (AGPS) au niveau des racines du palmier dattier (variété JHL) (marquage par l'anticorps CCRM7) avant (a) et après infection (b) par Foa	138
<i>Figure 10:</i> Révélation du Foa au niveau des racines du palmier dattier avec la WGA (wheat germ	138

agglutinin) couplée à la fluorescéine, en absence de nécrose localisée (a et a') et au niveau de la zone nécrosée (b)	138
Partie II	
Figure 1: Co-culture du Foa avec les champignons du compost de grignon, après une semaine d'incubation à 30°C, en milieu PDA.....	140
Figure 2 : Inhibition de la croissance du <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> (Foa) par les champignons du compost de grignon.....	140
Figure 3 : Inhibition de la sporulation du <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> (Foa) par les champignons du compost de grignon.....	140
Figure 4 : Sporocystes du champignon Ch1.....	141
Figure 5 : Sporocystes du champignon Ch2.....	141
Figure 6 : Co-culture de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> (Foa) et de Cp2Co5, après 15 jours d'incubation à 30°C, en milieu PDA (a) ; b : Foa en monoculture.....	142
Figure 7 : Inhibition de la croissance du <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> (Foa) par la bactérie Cp2Co5 ..	142
Figure 8: Inhibition de la sporulation du <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> (Foa) par la bactérie Cp2Co5..	142
Figure 9: Interaction <i>in vitro</i> entre la bactérie Cp2Co5 et <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> (Foa).....	143
Figure 10 : <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> incubé à 60°C en milieu PDA.....	143
Figure 11: Co-culture du <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> (Foa) avec la bactérie Cp2Co5 Observation microscopique après coloration par le bleu de trypan.....	144
DISCUSSION	
Figure 1 : Voies des phénylpropanoïdes proposées dans la défense du palmier dattier <i>contre Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	147
Figure 2 : Effet de l'acide salicylique sur certaines activités enzymatiques en relation avec l'établissement de la résistance du palmier dattier contre <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	150
Figure 3 : Schéma simplifié des deux voies des phénylpropanoïdes impliquées dans la défense du palmier dattier	153
LISTE DES TABLEAUX	
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
Tableau 1 : Exemples de couples R / Avr et leurs fonctions	19
Tableau 2 : Les familles de protéines PR	41
RESULTATS	
Publication 1	
Table 1: Effect of salicylic acid (50 µM) treatment on the survival of seedlings of two cultivars of date palm, one month after inoculation with <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> . Values are the mean of two repetitions, 50 plants per repetition. The results obtained were significantly different. SE≤ 5%	63

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS DE LA THESE.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I. Le palmier dattier et sa Fusariose vasculaire.....	3
1. L'agent causal, la colonisation de la plante hôte et les symptômes de la maladie du Bayoud	3
2. Les mécanismes de défense du palmier dattier et l'état actuel de nos connaissances.....	7
3. Les mesures de lutte contre la maladie de Bayoud.....	11
3.1 Des mesures prophylactiques à la sélection génétique	11
3.2 Les nouvelles stratégies de lutte, la lutte biologique et l'induction de la résistance.....	12
II. Les interactions plantes-pathogènes	13
1. Les types d'interactions plantes-pathogènes.....	13
2. Les systèmes de perception impliqués dans la reconnaissance des agents pathogènes.....	15
2.1. Les éliciteurs généraux et la reconnaissance non spécifique.....	15
2.2. La reconnaissance spécifique et le modèle gène-pour-gène.....	16
2.3. Les gènes R de résistance.....	16
2.4. Les gènes d'avirulence.....	18
2.5. Deux principaux modèles de reconnaissance R-Avr.....	18
III. Les mécanismes de signalisation impliqués dans la défense des plantes contre les agents pathogènes.....	20
1. Rôle des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la signalisation précoce associée à la défense des plantes.....	20
2. L'acide salicylique : une molécule clé dans la signalisation des réactions de défense chez les plantes.....	22
2.1. Structure et biosynthèse de l'acide salicylique.....	24
2.2. La signalisation dépendante de SA.....	26
2.3. Rôle du SA dans la résistance systémique acquise (SAR)	26
2.4. Le mode d'action du SA.....	28
3. La résistance systémique induite (ISR) et les voies de signalisation du contrôle biologique des maladies des plantes.....	29
3.1. Les agents de biocontrôle et la résistance systémique induite.....	29
3.2. L'ISR et la transmission du signal de l'immunité systémique des plantes.....	29
3.3. Interaction entre les différentes voies de signalisation.....	30
IV. Les outils de la défense des plantes.....	32
1. La réaction d'hypersensibilité.....	32
2. La paroi végétale.....	33
3. Stimulation du métabolisme secondaire : cas particulier du métabolisme Phénolique.....	35
3.1. Des métabolites secondaires antimicrobiens.....	35
3.2. Les métabolites phénoliques et la résistance aux maladies des plantes.....	36

a. La voie des phénylpropanoïdes et la synthèse des composés phénoliques.....	36
b. Rôle des composés phénolique dans la défense constitutive.....	38
c. Rôle des composés phénoliques dans la défense induite.....	38
3.3. <i>Protéines de défense, cas particulier des peroxydases.....</i>	39
MATERIEL ET METHODES	
I. Le matériel végétal, le pathogène et les agents de biocontrôle.....	43
1. Matériel végétal.....	43
2. Le pathogène.....	44
3. Les agents de biocontrôle.....	45
3.1. <i>Les bactéries testées pour le contrôle biologique de la maladie du Bayoud.....</i>	45
3.2. <i>Sélection de microorganismes antagonistes du Foa à partir du compost de grignon d'olives en vue de leur utilisation dans le contrôle biologique de la maladie du Bayoud.....</i>	45
II. Tests de confrontation et d'antagonisme.....	45
1. Antagonisme en milieu solide.....	45
2. Antagonisme en milieu liquide.....	47
3. Effets des bactéries sur la structure du mycélium du Foa.....	47
4. Effet du surnageant des bactéries sur la croissance du Foa.....	47
III. Traitements des plantes et leur inoculation par le pathogène.....	47
1. Traitement des plantes par l'acide salicylique.....	47
2. Traitement des plantes par les bactéries, agents du contrôle biologique.....	49
3. Evaluation de la protection du palmier contre le Bayoud.....	49
IV. Analyses biochimiques.....	49
1. Analyse des composés phénoliques et détermination de l'activité Phénylalanine ammonia-lyase.....	49
1.1. Extraction et dosage des composés phénoliques solubles.....	49
1.2. Extraction et dosage des composés phénoliques pariétaux.....	50
1.3. Analyse des composés phénoliques par HPLC.....	50
1.4. Activité phénylalanine ammonia-lyase (PAL)	50
2. Les composantes du stress oxydatif « burst oxydatif »	52
2.1. Activité catalase.....	52
2.2. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).....	52
2.3. La peroxydation des lipides.....	52
3. L'activité peroxydase.....	53
3.1 Détermination de l'activité peroxydase.....	53
3.2. Analyse qualitative de l'activité peroxydase	53
V. Les analyses microscopique et histochimique.....	53
1. Analyses histochimiques.....	53
1.1. Marquage des protéines.....	53
1.2. Histolocalisation des composés phénoliques.....	54
1.3. Histolocalisation de l'activité peroxydase.....	54
2. Immunohistolocalisation des polysaccharides pariétaux.....	54

2.1. Au niveau des cellules bordantes du palmier dattier.....	54
2.2. Au niveau des racines du palmier dattier	55
3. Caractérisation Ultrastructurale de l'interaction palmier dattier-Foa.....	56
VI Analyse statistique	56
 RESULTATS	
Chapitre 1 : L'induction du métabolisme phénolique par l'acide salicylique en relation avec la résistance du palmier dattier au <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>.....	57
Présentation de la publication 1	57
Publication 1: Effect of salicylic acid on phenolic compounds related to date palm resistance to <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>.....	59
 Chapitre 2 : Interaction palmier dattier-<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> : modulation du "burst oxydatif" et rôle de l'acide salicylique dans la potentialisation des réactions de défense ..	 71
Présentation de la publication 2	71
Publication 2 : <i>Phoenix dactylifera</i> L.-<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> interaction: potentiation of induced disease resistance by salicylic acid	73
 Chapitre 3: Approche histochimique et ultrastructurale de l'induction des réactions de défense du palmier dattier par l'acide salicylique.....	 89
Présentation de la publication 3.....	89
Publication 3: Structural and biochemical changes in Salicylic acid-treated date palm roots challenged with <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>.....	91
 Chapitre 4: Biocontrôle de la maladie du Bayoud par des microorganismes antagonistes du <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>.....	 109
Présentation de la publication 4.....	109
Publication 4 : Use of two bacteria for biological control of Bayoud disease caused by <i>Fusarium oxysporum</i> in date palm (<i>Phoenix dactylifera</i> L) seedlings.....	112
 RESULTATS NON PUBLIES	
Partie I: Implication de certaines molécules pariétales des cellules végétales dans l'interaction palmier dattier-<i>Fusarium</i>.....	131
Partie II : Sélection de microorganismes antagonistes du Foa à partir du grignon en cours de compostage en vue de leur utilisation dans le contrôle biologique de la maladie de Bayoud.....	139
 DISCUSSION GENERALE.....	145
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	155
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	157
ANNEXES.....	184

Interaction Palmier dattier-*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* : Induction des réactions de défense par l'acide salicylique et rôle de quelques microorganismes antagonistes de l'agent pathogène dans le contrôle de la maladie du Bayoud

Résumé

La maladie du Bayoud provoquée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa), constitue la principale maladie qui affecte le palmier dattier dans les régions sud du Maroc. Son expansion a été responsable de la perte de plus des deux tiers d'arbres de palmier dattier. Face à l'impact de cette maladie et de façon à pouvoir la contrôler, deux stratégies ont été adoptées dans le présent travail.

La première a consisté à induire les réactions de défense du palmier dattier par l'acide salicylique (SA). Ce qui a conduit à une réduction significative des taux de mortalité du palmier dattier inoculé par le Foa. Ce résultat a été obtenu en corrélation avec une augmentation marquée de la teneur des composés phénoliques, de H₂O₂ et du malonyldialdéhyde (MDA) d'une part et des activités phénylalanine ammonia-lyase et peroxydase d'autre part. En outre, l'activation de ces composantes dans les plantes traitées par le SA, s'est avérée plus importante après inoculation du Foa et elle est étroitement associée avec la formation d'une nécrose localisée, au niveau du site de l'infection, rappelant la nécrose de la réaction hypersensible (HR). Cette nécrose localisée a été positivement corrélée avec l'accumulation de H₂O₂ et du MDA et avec l'établissement de la résistance. Par ailleurs, l'analyse des composés phénoliques par HPLC, a conduit à l'identification des isomères d'acides cafféoylshikimiques présents de manière constitutive dans les racines du palmier dattier. Lorsque ces racines sont traitées par l'acide salicylique et inoculées par le Foa, de nouveaux composés phénoliques identifiés comme des dérivés d'acides hydroxycinnamiques et présentant une forte activité antifongique, ont été induits. Leur accumulation serait à l'origine de l'amélioration de la résistance du palmier dattier, obtenue à la suite du traitement par le SA. L'analyse histochimique des composés phénoliques dans les tissus racinaires du palmier dattier, a révélé des flavonoïdes au niveau des parois cellulaires du parenchyme vasculaire du xylème. Ces flavonoïdes ont été exprimés dans les racines qui sont à la fois traitées par le SA et inoculées par le pathogène, et seraient à l'origine des altérations cytologiques observées au niveau du mycélium du Foa, dans les racines du palmier dattier.

D'autre part, des microorganismes isolés à partir du compost de grignon des olives et deux bactéries, *Bacillus amyloliquefaciens* (Ag) et *Burkholderia cepacia* (Cs), isolées dans la rhizosphère de l'amandier, ont été testés pour leur rôle potentiel dans le contrôle de la maladie du Bayoud. Tous ces microorganismes ont montré un degré significatif d'inhibition de la croissance et de la conidiogénèse du pathogène. Ils agissent en engendrant des altérations morphologiques au niveau du mycélium du Foa et en libérant des molécules antifongiques qui limitent la croissance du pathogène. Lorsque les racines du palmier dattier sont traitées par, *Bacillus amyloliquefaciens* (Ag) et *Burkholderia cepacia* (Cs), la taille de la zone du brunissement développée au niveau du site d'inoculation du Foa, a été réduite annonçant la formation d'une nécrose localisée. Cette amélioration de la résistance a été positivement corrélée avec l'activation de la peroxydase et l'expression de nouveaux isomères de cette enzyme. Cela pourrait renforcer les parois cellulaires de la plante hôte limitant ainsi l'invasion des tissus par le pathogène. En outre, l'effet de ces deux bactéries sur le métabolisme phénolique a été examiné. Il s'est avéré que les composés phénoliques synthétisés sont différents selon que les plantes sont infiltrées par le pathogène ou par les bactéries. Le pathogène fait légèrement augmenter les isomères d'acides cafféoylshikimiques, alors que les deux bactéries induisent, de manière modérée, la synthèse de nouveaux composés phénoliques. Ces derniers sont identifiés comme des dérivés d'acides hydroxycinnamiques différents de ceux induits par le SA. Lorsque les racines sont à la fois injectées par le pathogène et les bactéries, la voie des acides cafféoylshikimiques semble entrer en compétition avec celle des acides hydroxycinnamiques, et l'une ou l'autre finit par prendre le dessus engendrant différents degrés de réaction de défense.

Les résultats obtenus dans ce travail permettent de mettre en évidence une mise en alerte (ou priming) des plantes de palmier dattier suite à leur traitement par l'acide salicylique ou par les bactéries antagonistes. Ils vont sans doute contribuer à comprendre les réactions de défense du palmier dattier contre son pathogène, et à envisager des nouvelles stratégies de lutte contre la maladie du Bayoud.

Mots clés : Palmier dattier, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, Acide salicylique, Contrôle biologique, Composés phénoliques, Peroxydase.

Date palm-*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* interaction: Induction of defense reactions by salicylic acid and role of some antagonistic microorganisms in Bayoud disease control

Abstract

The Bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa), is the main disease that affects date palm plants in southern regions of Morocco, and accounts for as much as 75% yield losses. Given the impacts of the disease and aiming at developing control measures, two strategies were investigated in this work. The first was to induce date palm defense reactions by salicylic acid (SA). This treatment led to a significant reduction in term of mortality of date palm plants inoculated with Foa. This result was accompanied with a marked increase in the content of phenolic compounds, H₂O₂ and malonyldialdehyde (MDA) and in phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities. Furthermore, the activation of these components was greater after Foa-inoculation and was associated with the formation of HR-like lesions around the point of infection. This localized necrosis was positively correlated with the accumulation of H₂O₂ and MDA and with resistance. Moreover, the HPLC analysis of phenolic compounds led to the identification of the cafféoylshikimiques acids derivatives presents constitutively in date palm roots. When date palm roots were treated with salicylic acid and inoculated with Foa, new phenolic compounds identified as hydroxycinnamic acid derivatives with a high antifungal activity, were induced. Their accumulation is related to the improvement of date palm resistance against its pathogen. The histochemical analysis of phenolic compounds in date palm root tissues, revealed flavonoids in the vascular parenchyma cell walls of the xylem. These flavonoids were expressed only in date palm roots treated with SA and inoculated with the pathogen. They are probably involved in the cytological alterations observed into the Foa mycelium colonizing date palm root tissues.

On the other hand, a few microorganisms isolated from the olive compost and two bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens* (Ag) and *Burkholderia cepacia* (Cs), isolated from almond tree rhizosphere, were tested for their potential role to control Bayoud disease. All these microorganisms have exhibited a significant inhibition of Foa growth and sporulation. They act by causing morphological alterations in the Foa mycelium and by releasing molecules with antifungal activity that restrict pathogen growth.

When date palm roots were infiltrated with *Bacillus amyloliquefaciens* (Ag) and *Burkholderia cepacia* (Cs), the size of the browning zone developed at the inoculation site of Foa, was reduced, announcing the formation of a localized necrosis. This improvement of resistance was positively correlated with the activation of the peroxidase and the expression of new isomers of this enzyme. This may strengthen the plant cell walls and limit tissue invasion by the pathogen.

Furthermore, the effect of the two bacteria on the phenolic metabolism was examined. It appeared that phenolic compounds were different depending on the microorganism infiltrated. The pathogen slightly enhanced the cafféoylshikimiques acid derivatives, while the bacteria induced, in a moderation amount, new phenolic compounds. These new phenols were identified as hydroxycinnamic acid derivatives and were different than those induced by the SA. When the roots were both injected by the pathogen and the bacteria, the cafféoylshikimique acids pathway seems to compete with hydroxycinnamic acids one, leading to various degrees of defense reactions.

The results obtained in this work highlighted the possible involvement of salicylic acid and of the antagonistic bacteria, in sensitizing date palm plants to respond faster to its pathogen “priming”. They are likely to contribute to understand date palm defense reactions against its pathogen, and to confer a promising strategy for effective control of the Bayoud disease.

Key words: date palm, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, Salicylic acid, Biological control, Phenolic compounds, Peroxidase.

التأثيرات البنية لنخيل الثمر و فوزاريوم أوكسيسبوروم ألبيدينيس : إثارة ردود الفعل الدافعية بواسطة حمض السليسيليك و دور بعض الكائنات المجهرية في التحكم في مرض البيوض

ملخص

يعتبر البيوض الناتج عن فطر فوزاريوم أوكسيسبوروم ألبيدينيس من أهم الأمراض التي تصيب شجر نخيل الثمر في المناطق الجنوبية للمغرب. وقد أدى انتشاره إلى ضياع ما يناهز 75 في المائة من أشجار النخيل. وأمام هذا المرض و حتى نتمكن من الحد من تأثيره، تم اعتماد استراتيجيتين مختلفتين في هذا العمل.

اهتمت الإستراتيجية الأولى بإثارة ردود الفعل الدافعية عند نخيل الثمر بواسطة حمض السليسيليك مما أدى إلى نقص ملحوظ في نسبة وفيات نخيل الثمر المحقون بفطر فوزاريوم أوكسيسبوروم ألبيدينيس. تزامنت هذه النتيجة مع ارتفاع محتوى كل من الفينولات، بيروكسيد الأكسجين و المانولين دياربيديك من جهة و نشاط كل من البيروكسيداز و الفينيل أمونيايلاز من جهة أخرى. بالإضافة إلى ذلك، تبين أن تنشيط مكونات المقاومة عند نخيل الثمر المعالج بحمض السليسيليك، تكون أكثر ارتفاعاً بعد الإصابة بفطر فوزاريوم أوكسيسبوروم ألبيدينيس و تكون كذلك مرتبطة بتشكيل نخر محلى على مستوى موضع الإصابة يشبه النخر الذي يتشكل عادة أثناء الاستجابة المفرطة الحساسية. من جهة أخرى، مكن تحليل الفيلونات من تشخيص بعض مشقات حمض الكافيين شيكيميك داخل جذور نخيل الثمر. و تؤدي معالجة هذه الجذور بحمض السليسيليك و حققها بفوزاريوم أوكسيسبوروم ألبيدينيس إلى إنتاج فينولات جديدة عبارة عن مشقات أحماض الهيدروسيناميك ذات نشاط مضاد للفطريات. و نعتقد أن تحسن مقاومة نخيل الثمر ضد البيوض المحصل عليه بعد المعالجة بحمض السليسيليك قد يكون ناجماً عن تراكم هذه الفينولات. و قد مكن التحليل الكيميائي لفينولات الأنسجة على مستوى الجذور، من الكشف عن الفلافونويد على مستوى الجدار الخلوي لنسيج الكسيلي. تشكلت هذه الفلافونيدات في الجذور التي خضعت في نفس الوقت للمعالجة بحمض السليسيليك و بالإضافة بالفطر و من المحتمل أن تكون المسئولة عن التغيرات الخلوية الملحوظة على مستوى فطر فوزاريوم أوكسيسبوروم ألبيدينيس.

من جهة أخرى، تم اختبار كائنات مجهرية عزلت من كومبوست بقايا الزيتون و بكتيرياتي باسيلوس أميلوليكيسيانس و بيركولديريا سبياسيلا المعزولتين من محيط جذور شجر اللوز، قدرتها على ضبط مرض البيوض. و قد تبين أن لجميع هذه الكائنات قدرة على كبح نمو و تبوغ فطر فوزاريوم أوكسيسبوروم ألبيدينيس. و تؤثر هذه الكائنات عن طريق إحداث تشوهات مورفولوجية على مستوى خوط الفطر و عن طريق تحرير مواد مضادة قادرة على الحد من نموه. عندما تم حقن جذور النخيل الثمري بكل من البكتيريات المذكورتين و الفطر الممرض، صغر حجم منطقة التلوين البني الذي يدل على انتشار الفطر داخل الجذور. و يعزى تحسن المقاومة هذا إلى التنشيط الملحوظ لأنزيم البيروكسيداز على مستوى جذور نخيل الثمر، مما قد يؤدي إلى تقوية الجدار الخلوي للنبات العائلي و الحد من انتشار الفطر الطفيلي.

بالإضافة إلى ما سبق، تم فحص تأثير البكتيريات على الإستقلاب الفينولي لجذور النخيل الثمري. و قد تبين أن الفينولات المنتجة تختلف حسب نوع الكائن المجهرى المحققون. ففي الوقت الذي يؤدي فيه الفطر الطفيلي إلى ارتفاع مشقات أحماض الكافيونلشيكيميك، يؤدي حقن البكتيريات إلى إثارة تركيب فينولات جديدة شخصت كمشقات أحماض الهيدروسيناميك من نوع مختلف عن تلك التي يشير لها حمض السليسيليك. أما عندما نحقن الفطر الممرض و البكتيريا في نفس الوقت، فيبدو وكأن مسلك مشقات أحماض الكافيونلشيكيميك يتتفق مع مسلك مشقات أحماض الهيدروسيناميك و ينتهي الأمر بتغلب أحد المسلكين على الآخر، فينتج عن ذلك ردود فعل دافعية من درجات مختلفة.

و يمكن القول أن النتائج المحصل عليها سمحت بالكشف على حالة التأهاب التي يصبح عليها نخيل الثمر إثر معالجته سواء بحمض السليسيليك أو بالبكتيريا المضادة للفطر. و هذه النتيجة سوف تساهم لا محالة في فهم ردود الفعل الدافعية عند نخيل الثمر و في التفكير في استراتيجيات جديدة لمحاربة مرض البيوض.

الكلمات المفاتيح: نخيل الثمر، فوزاريوم أوكسيسبوروم ألبيدينيس، حمض السليسيليك، محاربة بيولوجية، فينولات،

بيروكسيداز.

INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS DE LA THESE

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une monocotylédone pérenne de la famille des Arécacées adaptée à la vie dans les zones arides à conditions climatiques sévères. Cet arbre est d'une importance capitale dans la vie économique et sociale des populations sahariennes. Les activités liées à la commercialisation des dattes fournissaient un emploi à presque un million d'habitants des oasis sahariens du sud du Maroc et les récoltes de l'année suffisaient à elles seules à couvrir une grande partie de leurs dépenses. De plus, le palmier dattier est à l'origine d'un microclimat favorable à l'installation de cultures sous-jacentes arboricoles, maraîchères et fourragères luttant ainsi contre l'ensablement des oasis et la désertification des régions du sud.

La production moyenne des dattes au Maroc est de l'ordre de 72 milles tonnes/an avec plus de 82% de cette production dans les régions de Ouarzazate-Zagora et Errachidia. Les dattes sont différemment appréciées en raison de leurs apports alimentaires et de leur qualité gustative. Les meilleures variétés commerciales (Mejhoul, Bouskri, Boufeggous et Jihel) ne représentent que 25% du patrimoine phoenicique marocain, dont plus de 23% sont représentés par les variétés Jihel et Boufeggous.

Les palmeraies marocaines s'étendent tout au long des oueds Draa et Ziz sur une superficie de l'ordre de 44.000 ha. Elles sont caractérisées par une grande diversité génétique, 223 variétés et plus de 2 millions hybrides ont été recensés. Le rendement moyen est de l'ordre de 20Kg/pied, il varie d'une année à l'autre dépendamment des fluctuations climatiques (107 milles tonnes et 32 milles tonnes respectivement en 1991 et 2001 (Zaid, 2003)).

Durant les dernières années, la production des dattes a connu une diminution notable due surtout à la maladie de Bayoud causée par un champignon tellurique *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. On estime qu'elle a entraîné la disparition des 2/3 de la palmeraie marocaine (Fernandez et al., 1995) et elle continue de causer la mort de 4,5% à 12% des palmiers dattiers par an (Djerbi, 1983) et ce sont surtout les cultivars commerciaux de haute qualité qui sont attaqués. Ainsi, des 15 millions de pieds qui peuplaient les oasis au Sud de l'Atlas et dont la majorité était représentée par des variétés de bonne qualité, il ne reste que 4,7 millions de pieds constitués en grande partie par des variétés de faible valeur commerciale (Pereau-leroy, 1954). En Algérie, plus de 3 millions d'arbres ont été détruits à cause de la maladie de Bayoud, particulièrement dans les régions de Tidikelt, de Touat et de M'Zab (Brochard et Dubost, 1970a; Dubost, 1972). En Tunisie, la maladie de Bayoud n'a pas été signalée à ce

jour, mais il s'est avéré que la variété tunisienne Deglat Nour très commercialisée est hautement sensible à cette maladie.

De nombreux efforts ont été déployés pour lutter contre cette maladie, ils ont permis d'élucider quelques mécanismes de la défense du palmier dattier mais aucun n'a apporté des mesures efficaces susceptibles de limiter les dégâts dus à cette maladie.

L'objectif de ce travail s'inscrit dans le cadre de développement de nouvelles stratégies de lutte contre la fusariose vasculaire du palmier dattier.

Dans un premier volet, on s'est intéressé au rôle de l'acide salicylique dans l'induction des réactions de défense du palmier dattier et sa protection contre la maladie de Bayoud. Les réactions de défense étudiées comprennent la production de composés phénoliques (constitutifs et induits), l'activation de la PAL enzyme clé dans les voies des phénylpropanoides, la production des formes actives de l'oxygène et la peroxydation des lipides membranaires. Un intérêt particulier a été accordé aux peroxydases et aux composés phénoliques pour leur rôle dans la résistance du palmier dattier au Bayoud.

Des observations cytologiques et des analyses histologiques ont été entreprises, elles visaient la localisation des composés phénoliques et des peroxydases au niveau des tissus racinaires du palmier dattier traité par l'acide salicylique et inoculé par le pathogène. Cette étude a été confrontée à une observation, des mêmes tissus, au niveau ultrastructural.

L'analyse immunohistochimique a été aussi réalisée dans le but de révéler les polysaccharides pariétaux susceptibles d'intervenir dans l'interaction palmier dattier-*Fusarium*. Cette analyse a concerné aussi bien les tissus racinaires près de la zone d'infection, que les cellules bordantes situées au niveau de la pointe racinaire du palmier dattier.

Dans le deuxième volet de ce travail, le contrôle biologique de la maladie du Bayoud est abordé. Nous avons testé la possibilité de contrôler le Bayoud par des microorganismes antagonistes du Foa. L'étude a concerné l'interaction, *in vitro*, de ces microorganismes avec Foa ainsi que leur capacité d'induire les réactions de défense du palmier dattier contre son pathogène.

Les microorganismes utilisés sont:

- *Bacillus amylolequefaciens* strain Ag1 (Ag) et *Burkholderia cepacia* strain Cs5 (Cs), bactéries originaires du Laboratoire des Biopesticides, Centre de Biotechnologies de Sfax Tunisie.
- Des champignons (Ch1 et Ch2) et la bactérie Cp2Co5 isolés au sein de notre laboratoire à partir du grignon d'olives en cours de compostage.

I. Le palmier dattier et sa Fusariose vasculaire

1. L'agent causal, la colonisation de la plante hôte et les symptômes de la maladie du Bayoud

La maladie de Bayoud est causée par un champignon tellurique, *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa), appartenant au phylum des Deutéromycètes (champignons imparfaits). Ces formes imparfaites sont caractérisées par un mycélium septé et des conidies généralement unicellulaires situées sur des conidiophores; elles sont classées dans le groupe des Moniliales (Lepoivre, 2003).

L'hôte principal est le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L), cependant le Foa attaque également le palmier canarien (*Phoenix canariensis*). Tous les cultivars de haute qualité du palmier dattier sont susceptibles (Mejhoul, Deglet Nour, Jihel, Boufeggous, etc.). Certains cultivars ont montré une bonne résistance (Bousthhammi noire, Iklane, Sair Laylet), cependant, parmi ces cultivars, seul Sair Laylet est de qualité acceptable mais moins bonne que celle de Deglet Nour ou Mejhoul (Pereau-Leroy, 1954; Toutain et Louvet, 1974; Saaidi, 1979). Le Foa a été aussi isolé à partir de certaines plantes cultivées sous les arbres du palmier dattier, c'est l'exemple du henné (*Lawsonia inermis*), de la luzerne (*Medicago* sp.) et du trèfle (*Trifolium* sp) (Djerbi et al., 1985). Ces plantes qui sont des porteurs sains, ne montrent pas de symptômes de la maladie mais peuvent la transmettre à des palmiers sensibles (Djerbi et al., 1986). La maladie est répandue dans presque toutes les palmeraies du Maroc (figure 1a) et dans les oasis occidentales et centrales en Algérie (Benzaza et al., 1970; Brochard et Dubost, 1970a; 1970b). Elle affecte les différents stades de croissance du palmier dattier, en attaquant aussi bien les palmiers matures que les plus jeunes et même les rejets.

Le champignon est très inégalement réparti dans le sol, il a été isolé entre 0 et 30 cm de profondeur dans les sols des palmeraies infectées mais parfois il peut descendre jusqu'à 1 m (Tantaoui, 1989).

L'infection des palmiers se fait généralement à partir des pointes racinaires, le champignon pénètre dans les tissus vasculaires des racines, puis progresse et envahit tout le tronc. L'arbre meurt lorsque le champignon atteint le bourgeon terminal. Durant sa progression dans le xylème, le champignon colonise le parenchyme cortical en lui donnant une couleur rouge-brune caractéristique des arbres malades. Après la mort de l'arbre, le Foa persiste sous forme de chlamydospores dans les tissus de certains organes (racines, rachis, etc), (Louvet, 1977).

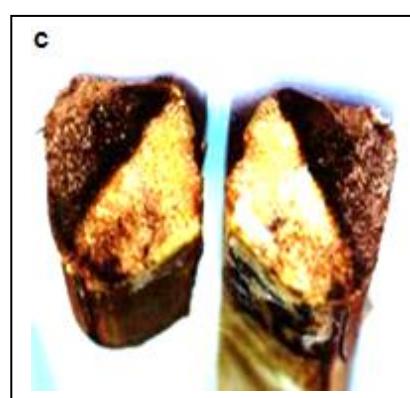


Figure 1: Symptômes de la maladie de Bayoud ; a : palmeraie infectée dans les zones du sud ; b : dessèchement et blanchiment unilatéral des palmes ; c : présence d'une coloration brune-rougeâtre foncée au niveau des rachis.

Le premier symptôme externe de la maladie, visible pour les observateurs expérimentés, apparaît sur une ou plusieurs feuilles de la couronne du milieu. La feuille affectée flétrit d'une manière caractéristique, les pennes d'un côté deviennent blanches depuis la base vers le sommet de la feuille, puis depuis le haut vers la base de l'autre côté de la feuille (figure 1b). Pendant ce blanchiment, la face dorsale du rachis devient brune (figure 1c), correspondant au passage du mycélium dans les faisceaux vasculaires du rachis. Ensuite, la feuille, ressemblant à une plume mouillée, pend le long du tronc. Ce processus peut prendre quelques jours à plusieurs semaines.

Le palmier meurt à partir de 6 mois à 2 ans après l'apparition des premiers symptômes, et ceci dépend des cultivars et des conditions de culture (Bulit et al., 1967; Louvet et al., 1970; Djerbi, 1982). Les symptômes de la maladie de Bayoud n'ont pas été jusqu'ici, signalés dans les fleurs ou les fruits (Koulla et Saaidi, 1985).

La propagation de la maladie se fait de différentes manières, par des rejets infectés, par le sol contaminé, par les plantes porteuses du champignon (henné, luzerne, ect.), par les tissus infectés (en particulier des morceaux de rachis infectés) et par l'eau d'irrigation. La maladie peut aussi se transmettre par contact entre les racines infectées et saines. L'ampleur de propagation de la maladie varie selon les conditions culturelles (irrigation abondante, fertilisation, etc) et la température. Le pathogène peut être isolé à partir de tissus du palmier dattier infecté ou à partir du sol et cultivé dans le milieu PDA (Potato Dextrose Agar). Les cultures du Foa apparaissent rose saumon (figure 2a), mais deviennent pourpre à violet lorsque les cultures vieillissent (figure 2b). Le mycélium du Foa est cloisonné et ramifié et présente trois types de spores (figure 3), les microconidies, les macroconidies et les chlamydospores. Les microconidies sont sphériques à allongées, légèrement incurvées, souvent unicellulaires et sont produites abondamment par le champignon. C'est le type de spore observé fréquemment à l'intérieur des vaisseaux des plantes infectées. Les macroconidies sont composées de 3 cellules, elles ont une forme recourbée typique avec une cellule apicale plus ou moins pointue. Les chlamydospores sont sphériques, isolées ou groupées en deux à trois cellules, entourées d'une paroi épaisse plus ou moins pigmentée, elles sont observées au milieu des hyphes ou en position terminale, souvent en forme de paires. Ces spores sont des formes de multiplication asexuée, mais permettent aussi au champignon de supporter des conditions environnementales sévères. Les chlamydospores peuvent persister dans le sol pendant plus de 8 ans même en absence de la plante hôte. En conditions défavorables ou lorsque les cultures vieillissent tous les fragments du mycélium

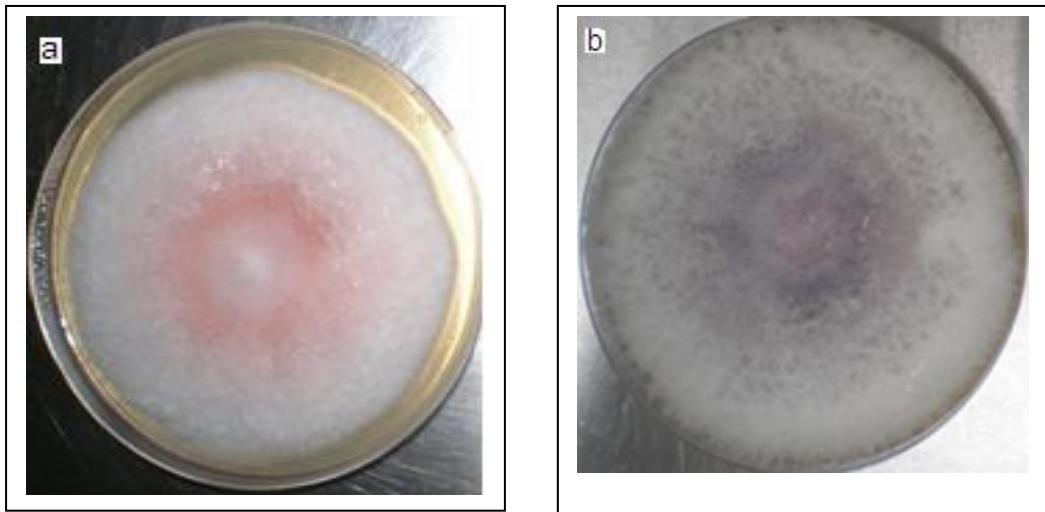


Figure 2: *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa), en milieu PDA (potato-dextrose agar ; a : Foa agé d'1 semaine, b : Foa âgé de deux semaines.

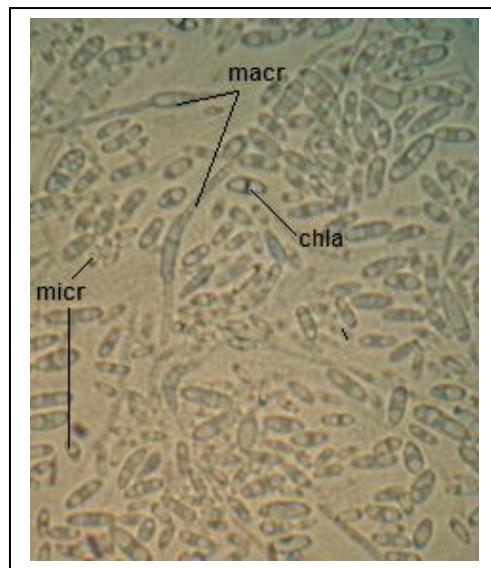


Figure 3 : Spores du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* sous microscope optique ($\times 400$);
micr: microconidies, macr: macroconidies,
chla : chlamydospores.

donnent des spores, ce qui confère à ce pathogène un grand pouvoir de multiplication et de propagation (figure 3). Les conditions thermiques de culture du Foa se situent entre 21°C et 27°C (Bounaga, 1975). Au-delà de 40°C le champignon ne se développe pas.

L'étude de la diversité génétique des différents isolats de Foa provenant de plusieurs palmeraies a montré que ces isolats appartiennent tous au même groupe de compatibilité et présentent tous le même profil RFLP et RAPD de restriction de l'ADN mitochondrial (Tantaoui and Boisson, 1991 ; Fernandez and Tantaoui, 1994 ; Tantaoui et al., 1996), bien qu'ils présentent des caractères phénotypiques différents (Cherrab, 1989).

Le mode d'action de l'agent pathogène n'est pas très bien élucidé, l'intervention d'enzymes hydrolytiques de type pectinolytiques et cellulolytiques (Amraoui, 1993) ou de types polygalacturonases, pectineméthyl-estérases, polygalacturaonate trans-éliminases, cellulases et protéases (El Modafar et El Boustani, 2000), a été décrite. Ces activités enzymatiques varient en fonction de l'agressivité des isolats (Amraoui, 1993). Des toxines peptidiques (El Fakhouri, 1993 ; Lotfi, 1997) et des acides fusarique et succinique (Mokhlisse-Dunad, 1987) ont été aussi mis en évidence dans le filtrat du Foa.

2. Les mécanismes de défense du palmier dattier et l'état actuel de nos connaissances

Les mécanismes impliqués dans la défense du palmier dattier contre Foa ne sont pas bien établis malgré les nombreux efforts investis dans ce sens. Ceci est en partie dû à la complexité de ce pathosystème mais aussi au fait que la plupart des travaux ont été réalisés sur des plantes provenant des graines ou « seedlings ». Ces seedlings présentent une forte hétérogénéité concernant leur comportement vis-à-vis du pathogène même si elles sont issues de plantes mères reconnues sensibles ou résistantes.

Malgré ces difficultés, certaines composantes se sont avérées si répétitivement associées à la défense du palmier dattier, qu'il est devenu évident qu'elles sont impliquées dans cette réaction. Ceci concerne surtout les composés phénoliques, mais aussi certaines protéines de défense comme les peroxydases.

Différentes approches d'études ont été adoptées :

- La comparaison des palmiers dattier infectés avec des palmiers sains,
- La comparaison des cultivars sensibles et résistants en absence de toute infection,
- La comparaison des réactions de défense des deux types de cultivars, sensibles et résistants, après leur inoculation par l'agent pathogène.

Dans toutes ces approches, la caractérisation des cultivars résistants et sensibles est une étape incontournable. Parmi les 223 cultivars du patrimoine phoenicicole marocain, seulement six

ont été reconnues résistantes au Bayoud (Saadi, 1992), il s'agit de Bousthammi noire, Bousthammi Blanche, Tadment, Iklane, Sair Laylet et Boufeggous ou Moussa.

La comparaison des cultivars sensibles et résistants a été adoptée dans plusieurs travaux. Cette approche a permis de mettre en évidence certaines composantes de la défense constitutive, mais elle ne prend pas en considération les réactions induites. Sur le plan anatomique et morphologique, aucune différence entre les plantes sensibles et résistantes n'a été signalée (Oihabi, 1984). Cependant, sur le plan moléculaire et biochimique, plusieurs études ont tenté d'identifier des marqueurs de la résistance. Baaziz (1989) a rapporté que l'activité peroxydase est plus élevée dans les cultivars résistants que dans les cultivars sensibles. De même, Benslimane et ces collaborateurs ont caractérisé les cultivars résistants sur la base de leurs ADN mitochondriaux ressemblant aux plasmides. Ils ont rapporté que le plasmide R (1346 pb) apparaît présent uniquement dans les cultivars résistants alors que le plasmide S (1454 pb) est présent uniquement dans les sensibles (Benslimane et al., 1994 ; Benslimane, 1995). Ce résultat n'a pas été mis en évidence chez tous les cultivars, et ne pourrait donc pas être pris comme marqueur de la résistance du palmier dattier (Bouâchrine, 1997).

Les premiers résultats de la réaction de la plante à l'infection par Foa, ont été rapporté par les travaux de Oihabi (1984) qui, en se basant sur des études histochimiques, a affirmé que la réaction de la plante hôte à l'infection se traduit par la production de gomme, de tannins et de thylles. Cette production a été notée aussi bien chez les cultivars sensibles que résistants et ne permet donc pas de distinguer entre les deux types de cultivars (Oihabi, 1984).

La première distinction biochimique entre les cultivars en relation avec la résistance a été établie à la suite de l'analyse des composés phénoliques racinaires, les racines des cultivars résistants se sont avérées plus riches en acides cafféoylshikimiques que les racines des cultivars sensibles (Ziouti et al., 1992). Ces composés phénoliques ont présenté une activité antifongique contre Foa *in vitro* et pourraient constituer une arme potentielle de la défense constitutive du palmier dattier (Ziouti et al., 1996). De plus, l'analyse de ces acides cafféoylshikimiques après l'infection par l'agent pathogène a montré une augmentation de ces composés plus importante dans les cultivars résistants par rapport aux cultivars sensibles (Ziouti, 1998).

Les composés phénoliques pariétaux ont été aussi décrits dans la résistance du palmier dattier au Foa. Rahmania en 1982 a décrit l'imprégnation des parois cellulosiques du phloème par la lignine en réponse à l'infection par Foa. De même, Baaziz (1990) avait rapporté que les racines des cultivars résistants du palmier dattier, présentent une forte activité férulique oxydase, impliquée dans la synthèse de la lignine, après leur infection par Foa. Par ailleurs, El

Modafar et ses collaborateurs, ont décrit un double rôle des phénols pariétaux, un rôle mécanique impliquant le renforcement des parois cellulaires par la lignine et les phénols pariétaux et un deuxième rôle chimique impliquant le pouvoir inhibiteur que ces phénols ont sur la croissance du pathogène et sur sa capacité à produire les enzymes hydrolytiques (El Modafar and El Boustani, 2000 ; 2001). Ces résultats sont confirmés par les multiples travaux de notre équipe ayant associé la résistance du palmier dattier avec l'activation des peroxydases, enzyme intervenant, entre autres, dans le renforcement des parois cellulaires de la plante hôte (Jaiti et al., 2004; El Hassni et al., 2004). Par ailleurs, Bouizgarne et al. (2004) ont rapporté qu'il est possible de distinguer les cultivars résistants des sensibles en se basant sur l'amplitude de la dépolarisation membranaire des poils absorbants suite à l'application de l'acide fusarique. Cette amplitude est beaucoup plus importante chez les cultivars résistants que chez les sensibles (Bouizgarne et al., 2004).

La défense induite à la suite de l'infection par les pathogènes, comprend des molécules nouvellement synthétisées, des protéines de défense et des phytoalexines. Chez le pathosystème palmier dattier-Foa, les résultats trouvés sont encore fragmentaires et ne permettent pas de proposer un mécanisme de défense ressemblant aux modèles établis chez d'autres plantes. Amraoui et collaborateurs (2005) ont identifié des chitinases et des polygalacturonases dans les racines du palmier dattier en réponse à l'infection par le pathogène. L'accumulation des dérivés de la coumarine notamment le propyl-7-aesculetin et l'hydroxy-5-propyl-7-aesculetin, a été décrite chez le palmier dattier après son infection par *Foa* (Assef, 1987; El Modafar et al., 1999). Le temps d'accumulation de ces phytoalexines distingue clairement les variétés sensibles des variétés résistantes (El Modafar et al., 1999). Dans notre équipe, trois isomères de position de l'acide cafféoylshikimique (figure 4), synthétisés de manière constitutive au niveau des racines du palmier dattier, ont été isolés, ils permettent de distinguer les cultivars sensibles des résistants. Cependant, après l'infection par le pathogène et en relation avec la réaction de défense de la plante hôte, ce sont surtout des dérivés des acides hydroxicinnamiques (figure 5) apparentés à des phénolamides et des dérivés de l'acide sinapique qui se sont avérés, de manière répétitive, impliqués dans la défense induite du palmier dattier (El Idrissi-Tourane, 1997; Ramos et al., 1997; El Hadrami et al., 1997; El Hadrami, 2002; Daayf et al., 2003; El Hassni et al., 2004; El Hassni et al., 2005). Ces composés phénoliques induits ont montré une forte activité antifongique *in vitro* inhibant la croissance et la germination du *Foa* (Ramos et al., 1997; El Hadrami et al., 1997) et pourraient être considérés comme des nouveaux phytoalexines impliquées dans la défense du palmier dattier. La compréhension des mécanismes de défense impliqués dans la résistance

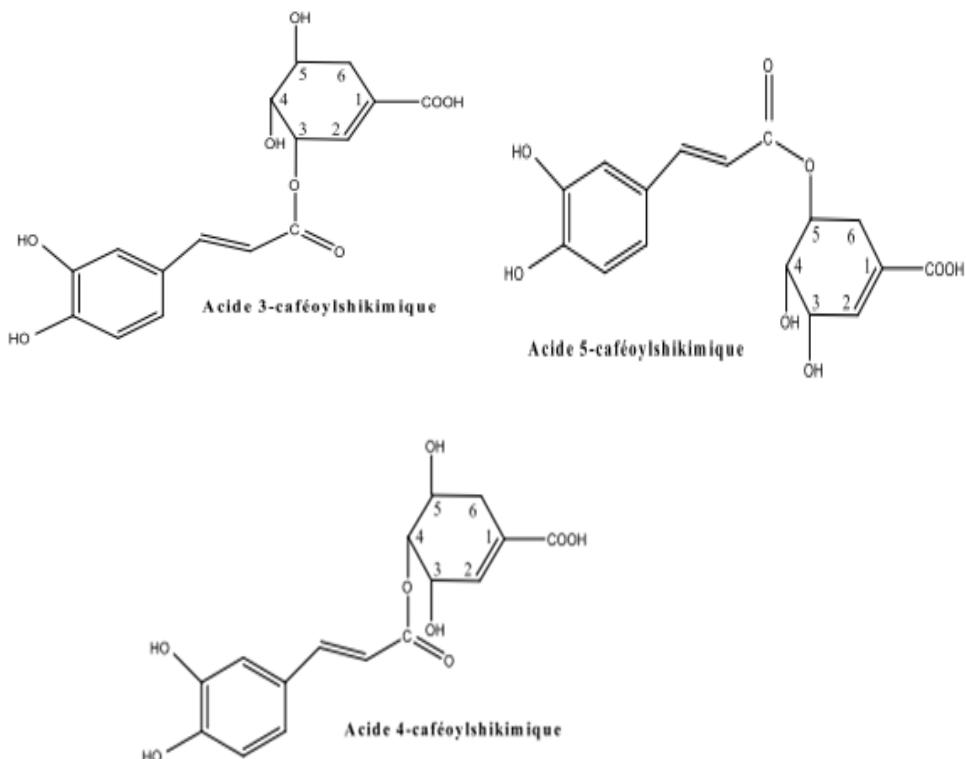


Figure 4 : Les isomères de position de l'acide cafféoylshikimique

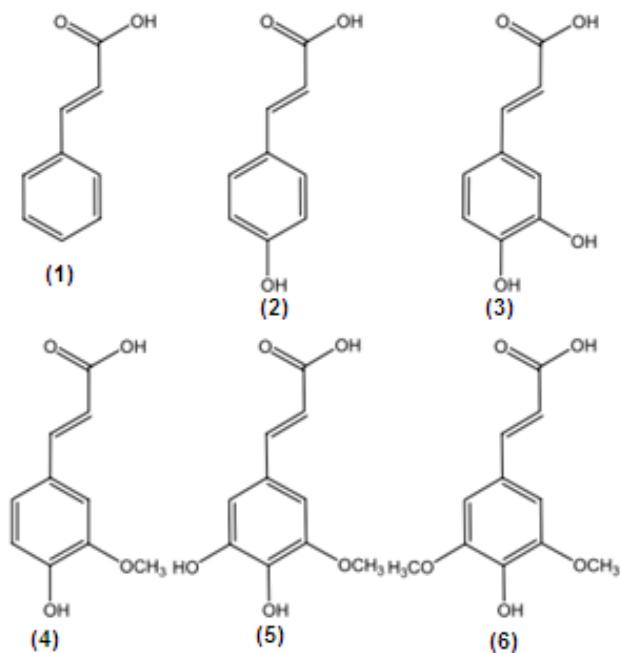


Figure 5 : Les acides hydroxycinnamiques : 1, acide cinnamique; 2, acide p-coumarique; 3, acide cafféique; 4, acide ferulique; 5, acide 5-hydroxyferulique; 6, acide sinapique.

du palmier dattier contre son agresseur est nécessaire pour pouvoir évaluer et envisager des méthodes de lutte contre la maladie de Bayoud. Le métabolisme phénolique dépend de l'activité Phénylalanine ammonia-lyase (PAL).

Il a été montré que la différence d'induction des réactions de défense du palmier dattier en réponse à l'infection par le pathogène est liée à une différence d'induction de l'activité PAL (El Modafar et al., 2001). Cette différence pourrait être liée à une suppression de l'induction de l'activité PAL dans les cultivars sensibles par rapport aux cultivars résistants (El Modafar et al., 2006).

3. Les mesures de lutte contre la maladie de Bayoud

3.1. Des mesures prophylactiques à la sélection génétique

La lutte contre la maladie de Bayoud est un défi qui a longtemps préoccupé les agriculteurs des zones du sud. Ils ont tenté, en vain, différentes méthodes traditionnelles allant jusqu'à bruler les arbres infectés. La meilleure solution consiste à protéger les champs sains en empêchant leur contamination par la maladie. Cette mesure a donné des résultats satisfaisants dans les palmeraies Tunisiennes, où la variété Deglat-Nour sensible au bayoud a pu être, jusqu'ici, protégée (Rhouma, 1996). Cependant, cette méthode ne peut pas constituer une solution à long terme et elle devient inefficace une fois le champ est infecté comme c'est le cas de la plupart des palmeraies marocaines et de certaines palmeraies algériennes. Les techniques culturales et notamment les plantations alternant les cultivars sensibles et résistants sont susceptibles de limiter la progression de la contamination mais elles ne permettent pas de la stopper. L'utilisation des produits chimiques (des fumigants comme le bromure de méthyle ou des pesticides tel que le bénomyle) pour lutter contre le Foa dans les champs apparaît contraignante et inefficace. Inefficace car le champignon peut atteindre des grandes profondeurs dans le sol sous forme de chlamydospores (Djerbi, 1982) s'échappant ainsi au traitement chimique (Nash, 1978). Contraignante car les fongicides sont des produits coûteux et polluants de l'environnement, et leur application dans les oasis sahariens, écosystèmes fragiles, risquerait d'avoir des conséquences néfastes sur leur équilibre écologique.

La méthode qui semble efficace est prometteuse est la lutte génétique consistant à sélectionner les variétés résistantes au Bayoud. Cette procédure est malheureusement accompagnée de facteurs génétiques défavorables à la qualité (Louvet et Toutain, 1973; Toutain et Louvet, 1974; Djerbi et al, 1986). La recherche de génotypes à la fois résistants et de bonne qualité fruitière à partir des hybrides naturels (Khalts) ou à partir de croisements dirigés entre des mâles résistants et des femelles de bonne qualité a fait l'objet de nombreux programmes de

sélection (Toutain et Louvet, 1974 ; Djerbi et al., 1985; Louvet et Toutain, 1973 ; Saadi, 1979). Cependant cette méthode est longue et son résultat n'est pas toujours sûr.

De plus, cette méthode est susceptible d'induire une sélection de populations de parasites capables de contourner cette résistance. La réhabilitation des palmeraies, dévastées par le Bayoud, par plantation des vitro-plants n'est pas une solution durable car elle ne permet pas d'offrir une protection contre le pathogène et la maladie reste une véritable menace pour ces vitro-plants.

3.2. Les nouvelles stratégies de lutte, la lutte biologique et l'induction de la résistance

Durant les dernières décennies, les mécanismes de résistance des plantes aux agents pathogènes ont commencé d'être compris avec l'introduction des concepts de résistance induite et de prémunition ou « priming » des plantes. Cette évolution a poussé notre équipe à orienter les recherches dans ce sens. C'est ainsi qu'on a tenté d'induire les mécanismes de résistance par traitement des plantes par l'acide jasmonique (Jaiti et al., 2004), et par des microorganismes susceptibles d'activer la défense contre l'agent pathogène (El Hassni et al., 2007). Cette dernière stratégie de lutte est appuyée par l'existence de sols répressifs empêchant le développement de la maladie de Bayoud (Sedra et Rouxel, 1989 ; Oihabi et al., 1992). Cette répression a été attribuée aux microorganismes antagonistes du Foa, notamment le genre *Pseudomonas* (Maslouhy, 1989) ou *Bacillus* (Chakroune et al., 2008) ou des champignons du genre *Aspergillus* ou *Penicillium* (Chakroune et al., 2008). Nous avons aussi montré que l'inoculation des racines de palmier dattier par des souches hypoagressives de Foa (El Hassni et al., 2004) ou leur mycorhization (Jaiti et al., 2008) sembleraient améliorer la résistance du palmier contre son pathogène. Ces modalités de lutte sont susceptibles d'induire les réactions de défense du palmier dattier contre son pathogène et pourraient constituer une alternative efficace et non polluante de contrôle de la maladie de Bayoud.

II. Les interactions plantes-pathogènes

1. *Les types d'interactions plantes-pathogènes*

Les plantes sont souvent exposées à des attaques parasitaires, elles doivent faire face à l'agression de champignons, de bactéries, de virus et de nématodes. Les phytopathogènes peuvent être classés en deux catégories, ceux qui tuent leur hôte et se nourrissent de son contenu (nécrotrophes) et ceux qui ont besoin d'un hôte vivant pour se nourrir et compléter leur cycle de développement (biotrophes). L'infection par un microorganisme peut engendrer une maladie, mais souvent, la plante se montre capable de lui résister naturellement, grâce à l'activation de ses mécanismes de défense. Les plantes ont donc élaboré au cours de leur évolution des défenses efficaces contre les divers agents pathogènes, et l'apparition d'une maladie est plus l'exception que la règle. Ces défenses consistent, en premier lieu, en des barrières structurales et biochimiques constitutives (paroi végétale, métabolites secondaires antimicrobiens...), un système préventif empêchant l'infection des plantes par la plupart des agents pathogènes. Parfois l'agresseur arrive à franchir ces barrières structurales, un arsenal défensif complexe et coordonné est ainsi déclenché, il vise à contourner les dispositifs pathogéniques du parasite l'empêchant de coloniser la plante hôte. Dans ce cas la plante est dite **résistante** et l'interaction est **incompatible**.

Lorsque les barrières structurales et chimiques sont inefficaces, et les réactions de défense de la plante insuffisantes, le pathogène envahit la plante et la colonise et les symptômes de la maladie s'expriment, le pathogène est dit **virulent**, la plante est dite **sensible** et l'interaction est **compatible**.

L'expression de la maladie ou le succès de la résistance dépendent en fait du rapport de force entre le pouvoir pathogène du parasite et sa capacité à contourner les mécanismes de défense de la plante d'une part, et de la capacité de celle-ci à réagir pour arrêter le pathogène et empêcher son développement, d'autre part.

Dans toutes interactions plantes-pathogènes, trois étapes sont à considérer (figure 6):

- la première étape est celle de la reconnaissance du parasite. Dans le cas d'une interaction incompatible, elle conduit le plus souvent à la mort programmée des cellules attaquées caractéristique d'une réaction hypersensible (HR).
- la deuxième étape appelée transduction du signal consiste en l'activation de cascades de signaux visant l'induction des réactions de défense.
- la troisième étape est caractérisée par l'activation des gènes de défense et la synthèse de plusieurs protéines et autres molécules de défense créant un environnement défavorable à l'invasion du parasite.

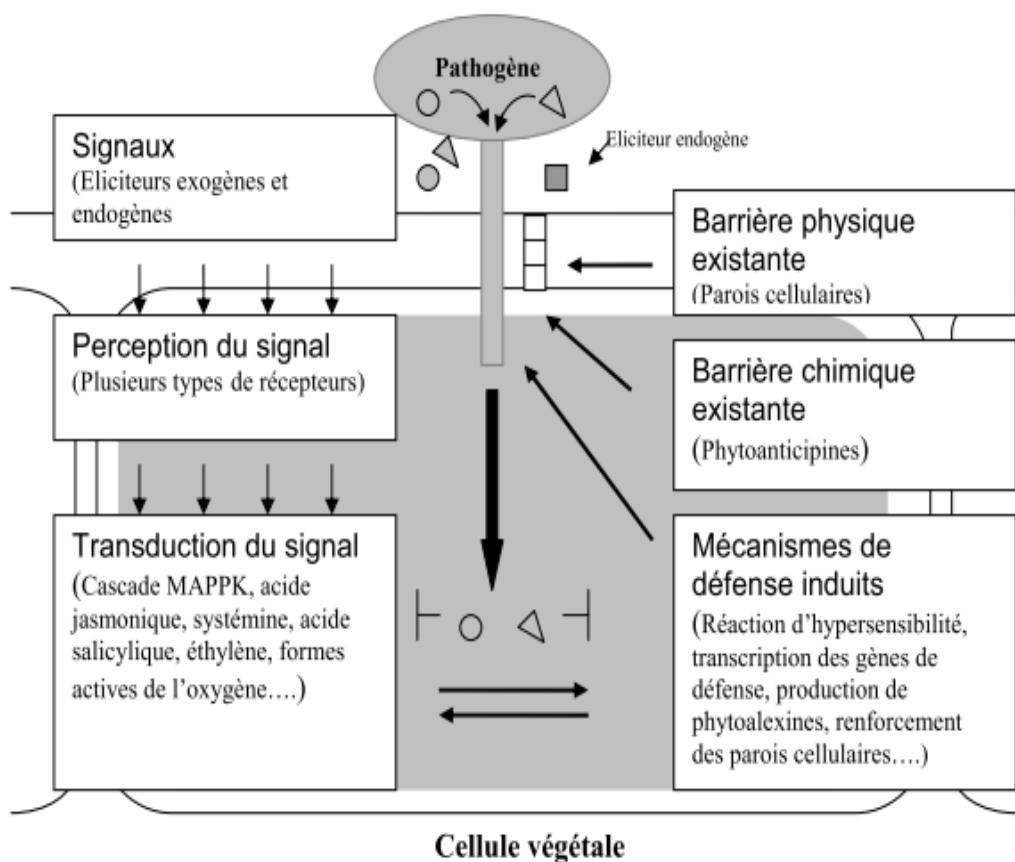


Figure 6: Schéma simplifié des principales étapes des réactions de défense élaborées par la plante suite à l'infection par un pathogène (Nürnberger et Lipka, 2005)

Les signaux émis lors de la deuxième étape peuvent s'étendre par la suite aux cellules adjacentes conduisant à une résistance locale acquise (LAR: local acquired resistance) puis gagner l'ensemble de la plante permettant une protection contre une large gamme d'agents pathogènes, on parle alors de résistance systémique acquise (SAR: Systemic acquired resistance) (Fritig et al., 1998; Durrant et Dangl, 2004).

2. Les systèmes de perception impliqués dans la reconnaissance des agents pathogènes

On conçoit aujourd’hui, que l’activation des mécanismes de défense des plantes résulte d’une cascade d’événements au cours desquels les plantes et les agents pathogènes échangent des signaux moléculaires. Les signaux déclenchant les mécanismes de défense sont appelés des éliciteurs. La reconnaissance d’un éliciteur produit par l’agent pathogène ou par la plante hôte permet l’activation des gènes spécifiques conduisant à l’expression des gènes de la défense. Certains éliciteurs sont spécifiques (reconnaissance gène pour gène), dans ce cas la plante reconnaît spécifiquement le pathogène et déclenche une réaction de défense qui conduit à la résistance (Montesano et al., 2003). D’autres éliciteurs sont généraux (reconnaissance non spécifique), ils stimulent les réactions de défense dans tous les génotypes d'une espèce végétale.

2.1. Les éliciteurs généraux et la reconnaissance non spécifique

Un éliciteur est une molécule capable d’induire au moins une des réponses typiques de défense en absence de toute infection (Dixon et al., 1994). Les éliciteurs généraux sont souvent des composés structuraux des parois cellulaires du pathogène (éliciteurs exogènes) ou de l’hôte (éliciteurs endogènes) libérés par l’action des enzymes hydrolytiques (Nürnberg, 1999). La caractéristique principale des éliciteurs généraux est qu’ils ne produisent pas la spécificité de reconnaissance gène pour gène (Keen et Dawson, 1992). Leur nature chimique est variée (Benhamou, 1996 ; Boller, 1995 ; Hahn, 1996), ils peuvent être des polysaccharides (Fritig et al., 1998); des lipides (Bostock et al., 1981 ; Granado et al., 1995) ou des (glyco) protéines (Bauer et al., 1995 ; Ricci et al., 1989). De nombreux éliciteurs exogènes appartiennent à la catégorie des PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) (Nürnberg et al., 2004). Ce sont des molécules microbiennes hautement conservées et susceptibles de déclencher une réaction de défense des plantes d’une manière non spécifique (Nürnberg et Brunner, 2002; Parker, 2003; Robatzek et al 2006).

2.2. La reconnaissance spécifique et le modèle gène-pour-gène

Ce sont les travaux de Flor, conduits sur l'agent de la rouille foliaire du lin (interaction *Melampsora lini-lin*) qui ont permis d'établir le premier modèle de reconnaissance entre les plantes et les agents pathogènes (Flor, 1971). Flor avait observé que la résistance était gouvernée par un gène dominant chez l'hôte, et que l'avirulence était gouvernée par un gène d'avirulence également dominant chez le pathogène. Flor a énoncé le concept de la relation gène pour gène selon lequel, à chaque gène de résistance de la plante hôte correspond, chez l'agent pathogène, un gène d'avirulence (figure 7). La résistance gène pour gène est connue aussi sous le nom de « résistance hôte spécifique » ou « résistance qualitative ». Les caractéristiques typiques et visibles de cette reconnaissance est la réaction hypersensible (HR) associée à une nécrose localisée et accompagnée par le déclenchement des réactions de défense. Ces réactions incluent la lignification, le renforcement des parois cellulaire, le dépôt de la callose, l'accumulation des phytoalexines et l'expression des gènes codant pour les PR protéines. Cette relation gène-pour-gène a été vérifiée pour de nombreux pathosystèmes (Thompson et Burdon, 1992; Crute et al., 1997) et représente toujours l'un des fondements de la reconnaissance entre une plante et son pathogène. Chez les plantes sensibles, les gènes Avr facilitent la pathogénicité en retardant le renforcement de la paroi et en interférant avec la transcription des gènes de défense (Montesano et al., 2003; Jones and Dangl, 2006; Stergiopoulos et Wit 2009).

2.3. Les gènes R de résistance

Depuis l'isolement du gène de résistance Pto, qui confère à la tomate la résistance contre *Pseudomonas syringae* pv *tomato* exprimant le gène d'avirulence AvrPto, plusieurs gènes R de résistance ont été identifiés et caractérisés à partir de différentes espèces végétales (Dangl et Jones, 2001; Meyers et al., 2003; McDowell, 2004; Meyers et al., 2005). Takken et Joosten (2000) ont caractérisé six classes de protéines codées par les gènes R (figure 8). Trois de ces classes contiennent des séquences répétées riches en leucine (LRR) (Leucine-rich repeats), parmi lesquelles la classe des protéines présentant un site de fixation des nucléotides (NB-LRR) est la plus abondante. Les NB-LRR protéines confèrent la résistance à une large gamme de pathogènes (virus, bactéries, champignons, oomycètes, nématodes et insectes). Les deux autres classes des protéines LRR impliquent les protéines transmembranaires LRR-TM et les protéines LRR-TM-kinase, protéines membranaires possédant une activité kinase. Les

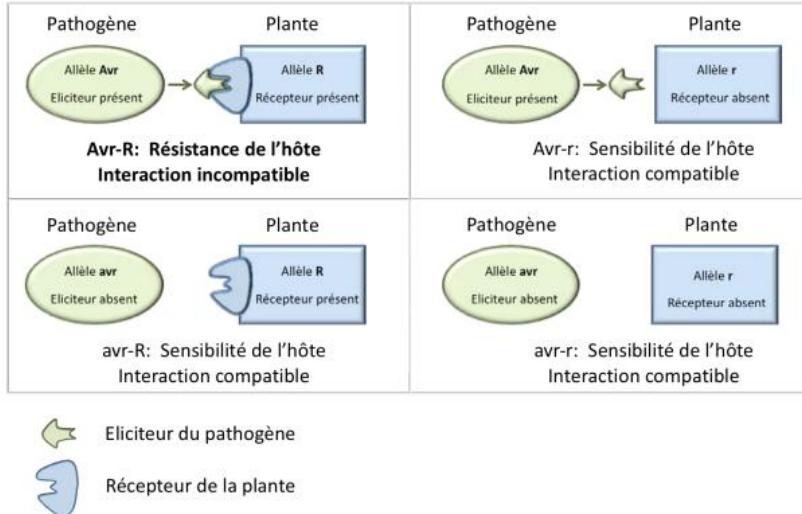


Figure 7: Représentation schématique de la relation gène pour gène (Mc Donald, 2004). L'allèle de résistance de la plante code pour un récepteur qui reconnaît un éliciteur produit par le pathogène. La reconnaissance de l'éliciteur du pathogène par le récepteur de la plante induit la mise en place des mécanismes de défense conduisant à la résistance (R/Avr). On parle alors d'interaction incompatible. Si la reconnaissance n'a pas lieu (éliciteur et/ou récepteur absent), la plante est sensible (r/Avr, R/avr, r/avr)

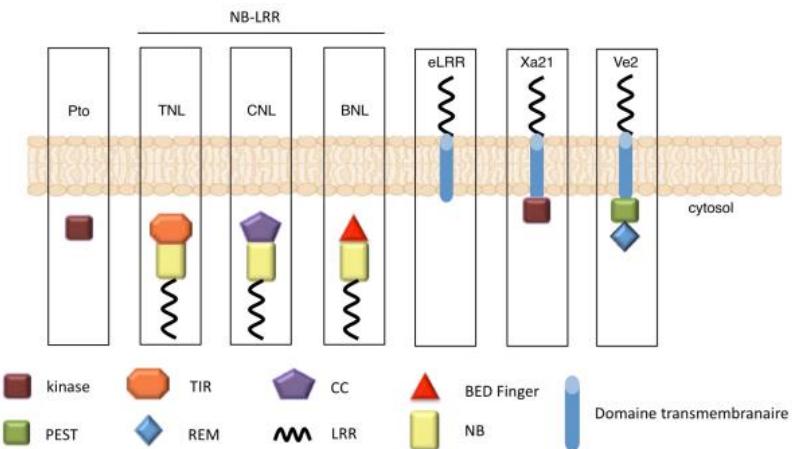


Figure 8: Structure des différentes classes des protéines codées par les gènes R chez les plantes (Dangl et Jones 2001; Eitas et Dangl 2010). La majorité de ces protéines possèdent un domaine riche en leucine (LRR) participant à la reconnaissance de l'agent pathogène ainsi qu'un domaine Nucleotide Binding (NB). En plus de ces deux domaines intracellulaires, la classe 2 possède un domaine Toll like et Interleukin1 like Receptor (TIR). La classe 3 possède un domaine Coiled-Coil (CC) et la classe 4 consiste en des protéines de résistance ancrées dans la membrane et possédant un domaine extracellulaire riche en leucine. Les classes 1 et 5 correspondent à des protéines uniques. La classe 1 correspond à la protéine Pto de la tomate et la classe 5 correspond à la protéine Xa21 du riz. La classe 6 correspond à des protéines de résistance qui possèdent des structures uniques telles que la protéine Ve2 de la tomate.

protéines LRR-TM interviennent dans la résistance envers les champignons et les nématodes, alors que les protéines LRR-TM-kinase confèrent la résistance contre les infections bactériennes (*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*). Les membres de la quatrième classe des protéines R représentent des protéines kinases, c'est le cas de la protéine Pto codée par le gène R de la tomate. La cinquième classe des gènes R est représenté par *RPW8*, des petites protéines membranaires possédant un domaine cytoplasmique en super-hélice (CC) qui confère à l'Arabidopsis la résistance contre l'oïdium (Xiao et al., 2001). Les gènes de résistance Ve contre la verticilliose de la tomate représentent la sixième classe de gènes R (Kawchuk et al. 2001). Les gènes Ve codent pour des glycoprotéines de surface (TM-surface) impliquées dans l'internalisation et la dégradation des protéines.

2.4. *Les gènes d'avirulence*

Le premier gène d'avirulence isolé et cloné est le gène bactérien *AvrA* de *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* (Staskawicz et al., 1984). Ce gène induit l'hypersensibilité dans les cultivars de soja, possédant le gène de résistance *Rpg2*. Depuis, de nombreux gènes d'avirulence ont été identifiés (Chisholm et al., 2006) (Tableau1).

Les gènes *Avr* codent soit pour des produits ayant une activité élicitrice directe sur les réactions de défense (Leach et White, 1996) (c'est le cas du produit du gène *Avr9* isolé à partir du champignon *Cladosporium fulvum*), soit pour des enzymes impliquées dans la synthèse de molécules élicitrices, comme *Avr4* de *Pseudomonas syringae* qui code pour une enzyme impliquée dans la synthèse des syringolides, responsable de l'induction d'une HR dans certains cultivars de soja. Les produits des deux gènes *Avr4* et *Avr9* induisent une HR dans des cultivars de tomate portant respectivement des gènes de résistance *Cf-4* et *Cf-9* (Hammond-Kosack et Jones, 1996 ; May et al., 1996).

2.5. *Deux principaux modèles de reconnaissance R-Avr*

Les gènes *Avr* codent pour des effecteurs qui sont reconnus spécifiquement par les protéines R. Cette reconnaissance peut se faire directement par contact physique entre les deux molécules. Ce modèle récepteur-ligand reflète l'interprétation la plus simple de Flor dans son hypothèse gènes pour-gène. Les interactions directes ont été décrites pour les produits du gène *Pto* de la tomate et ceux du gène *AvrPto* du *Pseudomonas syringae* (Tang et al., 1996). La perception indirecte des protéines *Avr* est réalisée lorsque des protéines R ne reconnaissent pas directement la protéine *Avr* mais plutôt le produit de l'interaction des protéines *Avr* avec une cible dans la cellule végétale. La protéine R agirait dans cette interaction en protégeant la

Tableau 1 : Exemples de couples R / Avr et leurs fonctions (Chisholm et al., 2006)

Effecteurs	Organismes	Fonction biochimique	Cible végétale	Gène R	Plante	Classe
AvrRpt2	<i>Pseudomonas syringae</i>	Protéase	RIN4	RPS2	Arabidopsis	CC-NB-LRR
AvrB	<i>Pseudomonas syringae</i>	Protéase	RIN4	RPM1	Arabidopsis	CC-NB-LRR
AvrRPM1	<i>Pseudomonas syringae</i>	Protéase	RIN4	RPM1	Arabidopsis	CC-NB-LRR
AvrPphB	<i>Pseudomonas syringae</i>	Protéase	PBS1	RPS5	Arabidopsis	TIR-NB-LRR
PopP2	<i>Ralstonia solanearum</i>	Cystéine protéase	-	RRS1-R	Arabidopsis	TIR-NB-LRR-WRKY
Avr-Pita	<i>Magnaporthe grisea</i>	Métalloprotéase	-	Pi-ta	Riz	NB-LRR
AvrPtoB	<i>Pseudomonas syringae</i>	E3 ligase	-	Pto	Tomate	STK
XopD	<i>Xanthomonas campestris</i>	Cystéine protéase	SUMO	-	Arabidopsis	-
Avr2	<i>Cladosporium fulvum</i>	Inhibiteur de protéases	Rcr3	Cf-2	Tomate	eLRR
Avr4	<i>Cladosporium fulvum</i>	-	Chitinase	Cf-4	Tomate	eLRR
-	<i>Xanthomonas oryzae</i>	-	-	Xa21	Riz	eLRR

cible contre l'action des protéines Avr; ce modèle est appelé «guard hypothesis» ou «modèle de garde» (figure 9) (Dangl et Jones, 2001). Sur la base de ce modèle, on conçoit les protéines Avr comme des effecteurs qui interagissent avec des protéines de la plante et inhibent ses défenses basales en faveur du parasite. Dans ce dernier modèle les protéines R constituent des gardiens qui reconnaissent les complexes protéines cibles-protéines Avr. Cette reconnaissance peut initier les mécanismes de défense de la plante (Dangl et Jones, 2001; Nimchuk et al. 2003 ; Jones et Dangl 2006).

III. Les mécanismes de signalisation impliqués dans la défense des plantes contre les agents pathogènes.

Suite à la perception de l'agent pathogène par la plante, de nombreux composants intervenants dans les cascades de signalisation sont activés (Torres-Zabala et al., 2007; Miranda et al., 2007). Ils incluent les événements précoce impliqués dans la réaction hypersensible (Heath, 1998; 2000) comme la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et du monoxyde d'azote (NO), la modification des flux ioniques et l'activation des cascades des protéines kinases. Tous ces événements sont nécessaires à l'expression des gènes de défense contrôlant la production des composés anti-microbiens (Jones et Dangl, 2006). En fait, les premières étapes de signalisation permettent de faire le lien entre la reconnaissance de l'agent pathogène et la défense induite. L'intervention de phytohormones telles que l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène, constitue aussi une des caractéristiques importantes des voies de signalisation de la résistance (Durrant et Dong, 2004; Fujita et al., 2006; Torres-Zabala et al., 2007).

1. Rôle des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la signalisation précoce associée à la défense des plantes

Les espèces actives de l'oxygène sont constituées essentiellement du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et du radical hydroxyle (OH^{\cdot}) (Torres et al., 2006). Ces espèces sont générées normalement par la chaîne de transport d'électrons au niveau des mitochondries et des chloroplastes mais aussi par des oxydases membranaires (Apel et Hirt 2004). Cependant, une augmentation rapide et localisée de leur production (phénomène communément appelé «burst» oxydatif) est souvent détectée suite à l'attaque par des agents pathogènes (Mehdy, 1994; Lamb et Dixon, 1997; Able, 2003; Lee et Hwang, 2005).

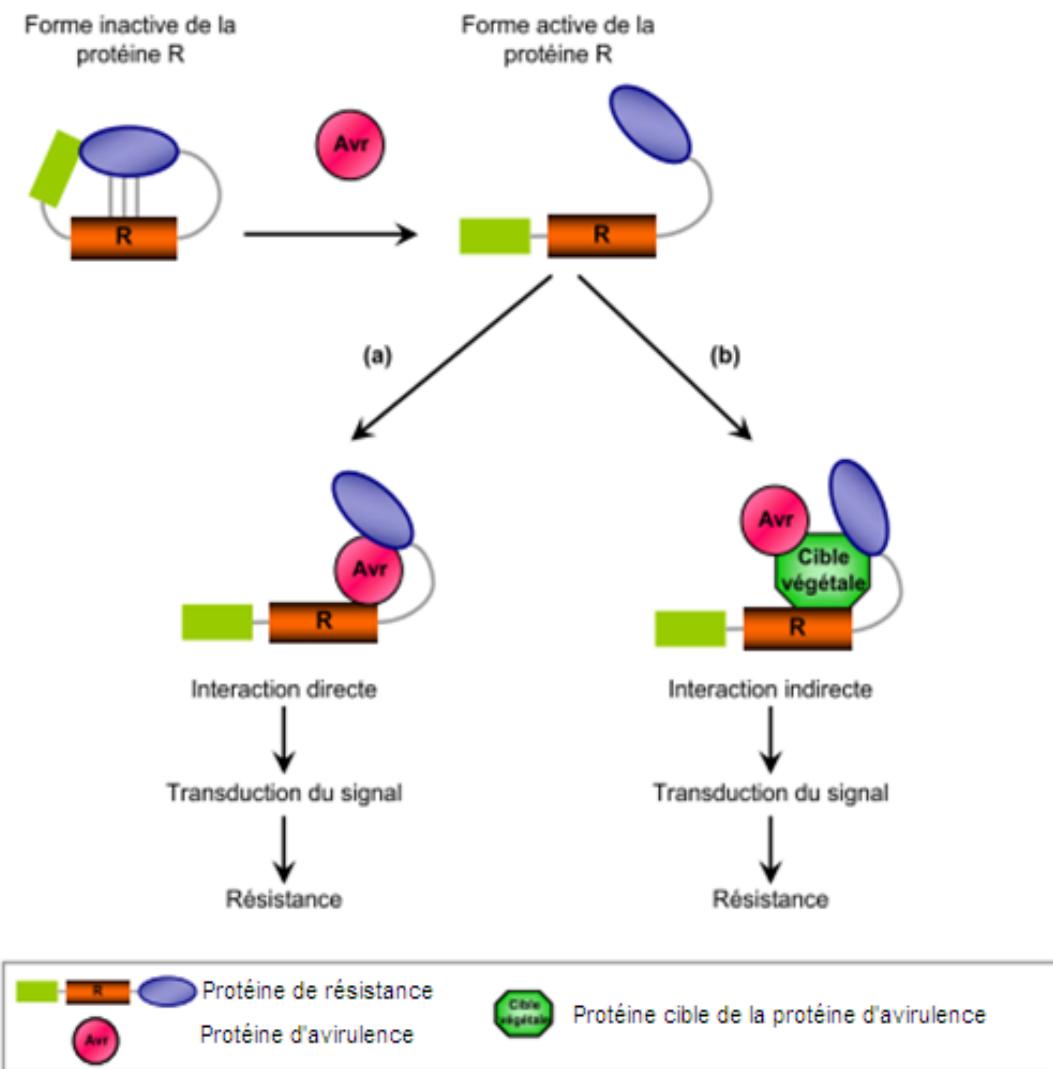


Figure 9: Mécanismes de reconnaissance plante-pathogène: modèle de garde (Liu et al., 2007). En absence d'agent pathogène, les protéines R végétales sont inactives. Quand une protéine Avr est introduite dans la cellule végétale, la protéine R correspondante peut être activée selon 2 mécanismes différents: (a) soit la protéine Avr interagit directement avec la protéine R et déclenche l'activation des réponses de la plante, (b) soit la protéine Avr interagit directement avec une cible protéique végétale qui interagit à son tour avec une protéine R qui permet la formation d'un complexe nécessaire à l'induction de la résistance.

Différents rôles ont été attribués aux ROS (figure 10), ils participent au renforcement de la paroi des cellules végétales comme ils peuvent constituer des composés antimicrobiens, ils peuvent également intervenir comme des messagers dans les voies de signalisation en relation avec la défense des plantes contre les phytopathogènes (Gechev and Hille, 2005).

Dans la majorité des interactions plantes-pathogènes, le «burst oxydatif» est biphasique. Le premier pic de H_2O_2 est précoce et transitoire, il est non spécifique de la réponse à un agent pathogène (Adam et al., 1989). La deuxième phase est tardive et plus durable, elle est observée uniquement au cours d'une interaction incompatible (Wojtaszek, 1997) suite à la reconnaissance spécifique des protéines Avr par les protéines R (Able, 2003; Torres et al., 2006). Cette phase engendre la mort des cellules en raison de la forte toxicité engendrée par les molécules produites. Ces formes actives de l'oxygène pourraient être impliquées dans la régulation de la mort cellulaire programmée (PCD), elles ont été détectées au niveau des cellules bordant les lésions associées à la HR lors de l'interaction entre l'Orge et le champignon *Blumeria graminis* (Trujillo et al., 2004).

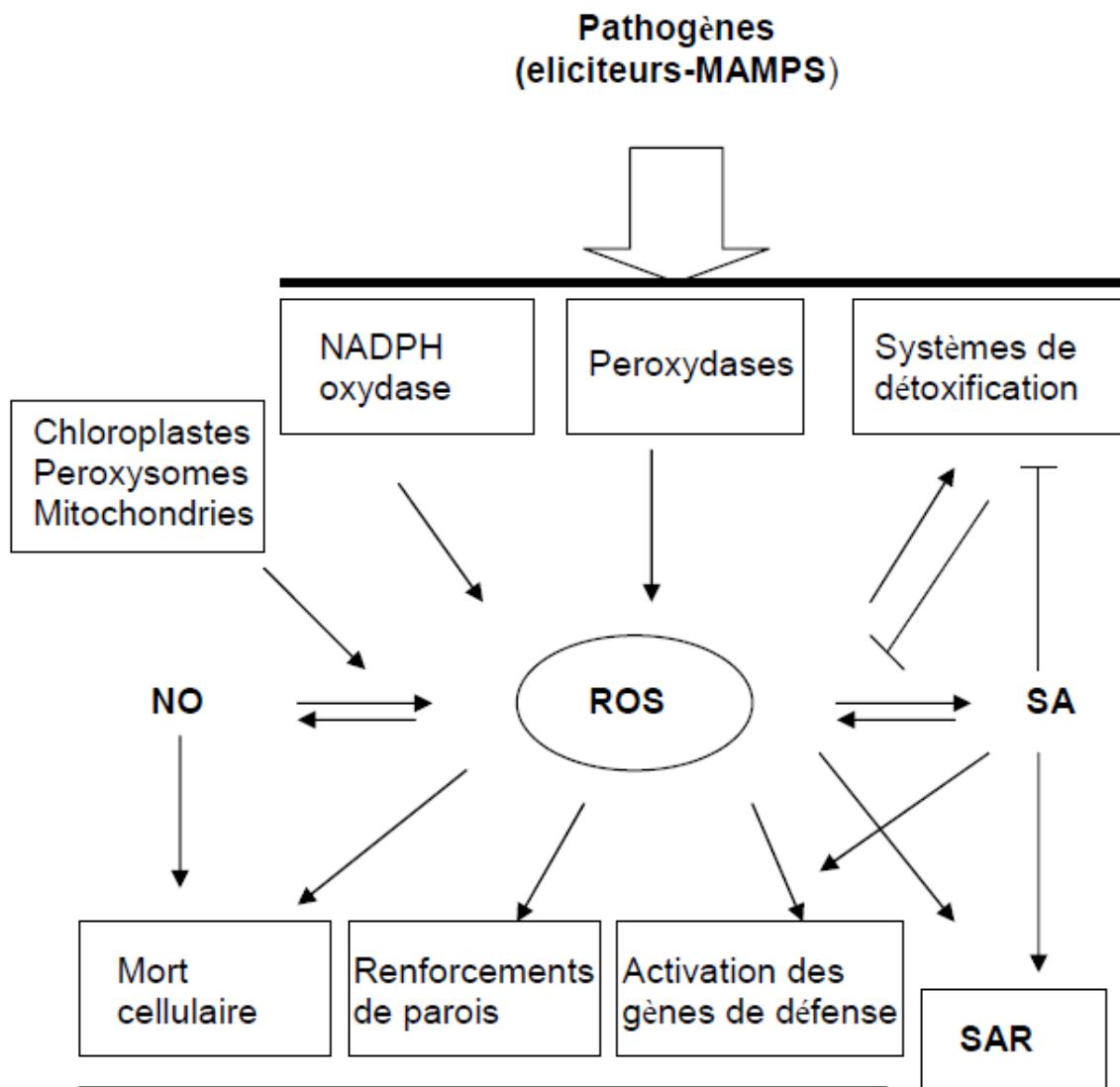
Le NADPH oxydase, enzyme des membranes des chloroplastes, des mitochondries et des peroxysomes (Torres and Dangl, 2005), est l'une des premières sources de production des ROS (Brisson et al. 1994). Cependant, d'autres enzymes ont été décrites associées à cette production, notamment les oxalate oxydases (De Gara et al. 2003), les peroxydases pariétales (Bolwell et al. 1999; Martinez et al., 1998), les amines oxydases (Cona et al., 2006) et les lipooxygénase (Croft et al. 1990).

Trois modes d'action ont été proposées concernant l'implication des ROS dans la signalisation et l'expression des gènes de défense (Mittler et al., 2004).

- Le déclenchement des cascades de signalisation par l'intermédiaire de récepteurs, non encore identifiés, des ROS,
- L'inhibition directe de l'activité phosphatase et l'activation conséquente des kinases spécifiques,
- La modification de l'activité de certains facteurs de transcription intervenant dans la régulation de l'expression des gènes de défense.

2. L'acide salicylique : une molécule clé dans la signalisation des réactions de défense chez les plantes

La découverte de l'acide salicylique date de 1828 quand Johann Buchner a isolé, à partir de l'écorce de saule, le glucoside d'alcool salicylique. Le nom de l'acide salicylique (SA) a été donné par Raffaele Piria en 1838. Et c'est en 1874 en Allemagne que la première production



REPONSES DE DEFENSE INDUITES

Figure 10: Sources et fonctions des ROS chez les plantes suite à l'infection par des agents pathogènes (Torres et al. 2006). ROS, formes actives de l'oxygène ; NO, monoxyde de l'azote ; SAR, résistance systémique acquise ; SA, acide salicylique.

commerciale du SA synthétique a débutée, son dérivé l'acide acétylsalicylique a été introduit sous le nom commercial d'aspirine en 1898.

Depuis la découverte en 1990 de la production de l'acide salicylique lors de l'établissement de la résistance systémique chez le concombre et le tabac, beaucoup d'efforts ont été déployés pour élucider le rôle de cette molécule dans cette résistance (Métraux et al., 1990 ; Malamy et al., 1990 ; Raskin, 1992 ; Delaney et al., 1994). Chez le tabac, il a été montré que les mêmes gènes activés dans la réaction de défense contre le virus de la mosaïque de tabac (TMV) sont exprimés par application du SA (Ward et al., 1991). Par la suite, l'acide salicylique a été reconnu comme molécule de signalisation dans la défense des plantes contre divers agents pathogènes (Enyed et al., 1992 ; Gaffney et al., 1993).

2.1. Structure et biosynthèse de l'acide salicylique

Chimiquement, le SA appartient à un groupe de composés phénoliques qui possèdent un anneau aromatique et un groupe hydroxyle. C'est une petite molécule de 138,1g de poids moléculaire, peu soluble dans l'eau, soluble dans des solvants organiques.

Deux voies de biosynthèse du SA ont été décrites (figure 11):

- La voie des shikimate-phénylpropanoïdes (Hermann et Weaver, 1999). Elle commence par la conversion du phénylalanine en acide trans-cinnamique par la PAL (phénylalanine ammonialyase). L'acide trans-cinnamique donne le SA après une chaîne de réactions produisant l'acide benzoïque qui en subissant une hydroxylation au niveau du carbone 2 donne l'acide salicylique (Yalpani et al., 1993). Cette dernière étape est catalysée par la cytochrome P450 monooxygénase appelée aussi l'acide benzoïque hydroxylase (BA2H) dont l'activité est induite par l'application de l'acide benzoïque ou par les agents pathogènes (Leon et al., 1995).

L'étape limitant de la production du SA est celle entre l'acide trans-cinnamique et l'acide benzoïque (Yalpani et al., 1993). Le mécanisme de production de l'acide benzoïque à partir de l'acide trans-cinnamique est inconnu. Il pourrait s'agir d'une hydroxylation rappelant la β oxydation des acides gras. Cette suggestion est soutenue par des études faites chez le *Quercus pedonculata* chez qui il a été montré que la transformation de l'acide trans-cinnamique en SA est stimulée par l'acétyl-coA et l'ATP (Alibert and Ranjeva, 1971).

- Cependant, il a été montré que quelques plantes sont capables de synthétiser le SA à partir du chorismate. Cette voie de synthèse implique deux enzymes, l'isochorismate synthase (ICS) et l'isochorismate pyruvate lyase (IPL) (Vasyukova et Ozeretskaya, 2007).

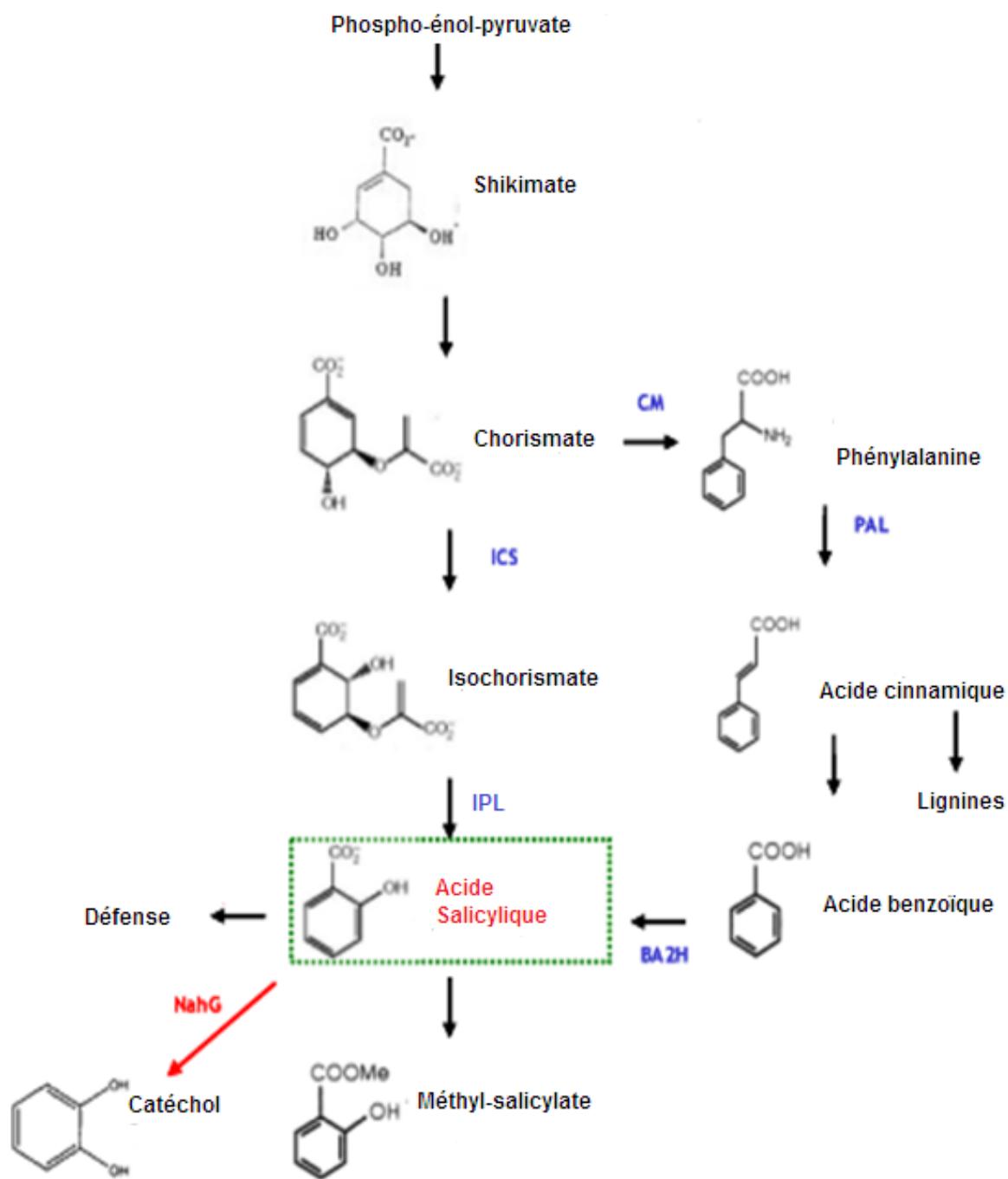


Figure 11: Représentation simplifiée des voies de biosynthèse de l'acide salicylique (Wildermuth et al., 2001 ; Lee et al., 1995). Les enzymes responsables des transformations sont indiquées en bleu. Les plantes NahG expriment la salicylate hydroxylase qui dégrade le SA en catéchol. ICS, Isochorismate synthase; PAL, phénylalanine ammonia-lyase; BA2H, l'acide benzoïque 2-hydroxylase; IPL, Isochorismate pyruvate lyase.

La première enzyme catalyse la conversion du chorismate en isochorismate, et la deuxième la conversion de ce dernier en SA. L'expression des gènes bactériens ICS et IPL dans des plantes de tabac et d'Arabidopsis a engendré une accumulation de SA et une amélioration de la résistance contre les agents pathogènes (Verberne et al. 2000; Mauch et al. 2001). Cette voie s'est aussi avérée active chez la Tomate (Uppalapati et al., 2007).

Les études de Wildermuth et al. (2001) ont montré que le mutant d'Arabidopsis sid2 (eds16) (salicylic acid induction deficient 2; enhanced disease susceptibility 16) affecté dans le gène ICS, accumule très peu de SA et présente une sensibilité accrue aux maladies.

2.2. La signalisation dépendante de SA

L'étude génétique d'Arabidopsis sur la base de l'expression des gènes PR en réponse à un traitement SA a conduit à l'identification de plusieurs allèles d'un même gène le NPR1 (Delaney et al. 1995; Glazebrook et al. 1996; Ryals et al. 1997; Shah et al. 1997). Le mutant npr1 (Non expressor of PR genes 1) est caractérisé par l'absence d'induction du gène PR1 en réponse à un agent pathogène et au signal SA. Il semble que NPR1 joue un rôle essentiel dans la transduction du signal SA. En effet, l'application du SA ou ses analogues provoque la translocation de NPR1 du cytoplasme vers le noyau, ce qui s'avère nécessaire pour les étapes ultérieures de signalisation (Kinkema et al. 2000). NPR1 interagit avec des facteurs de transcription de type TGA (Li et al., 1999) susceptibles de reconnaître de manière SA- et NPR1-dépendante le promoteur de PR1 (Johnson et al., 2003).

Par ailleurs, Falk et al., 1999 ont montré que les mutants eds1 (affecté dans la production de SA) et pad4 (phytoalexin deficient 4) présentent tous les deux un défaut d'accumulation de SA et d'induction des gènes PR. En effet, il a été établie que les phénotypes EDS1 et PAD4 contribuent à l'accumulation du SA et à l'établissement de HR (figure 12) (Feys et al., 2001). De plus l'expression de PAD4 et EDS1 est induite par un traitement SA, ce qui implique la présence d'une boucle de rétrocontrôle concernant la production du SA (Feys et al., 2001).

2.3. Rôle du SA dans la résistance systémique acquise (SAR)

Après la formation d'une lésion nécrotique constituant aussi bien un signal de la réaction hypersensible qu'un symptôme de la maladie, la voie de la SAR est activée. Cette activation permet une résistance systémique contre une large gamme de pathogènes (Hunt et Ryals, 1996 ; Neuenschwander et al., 1995).

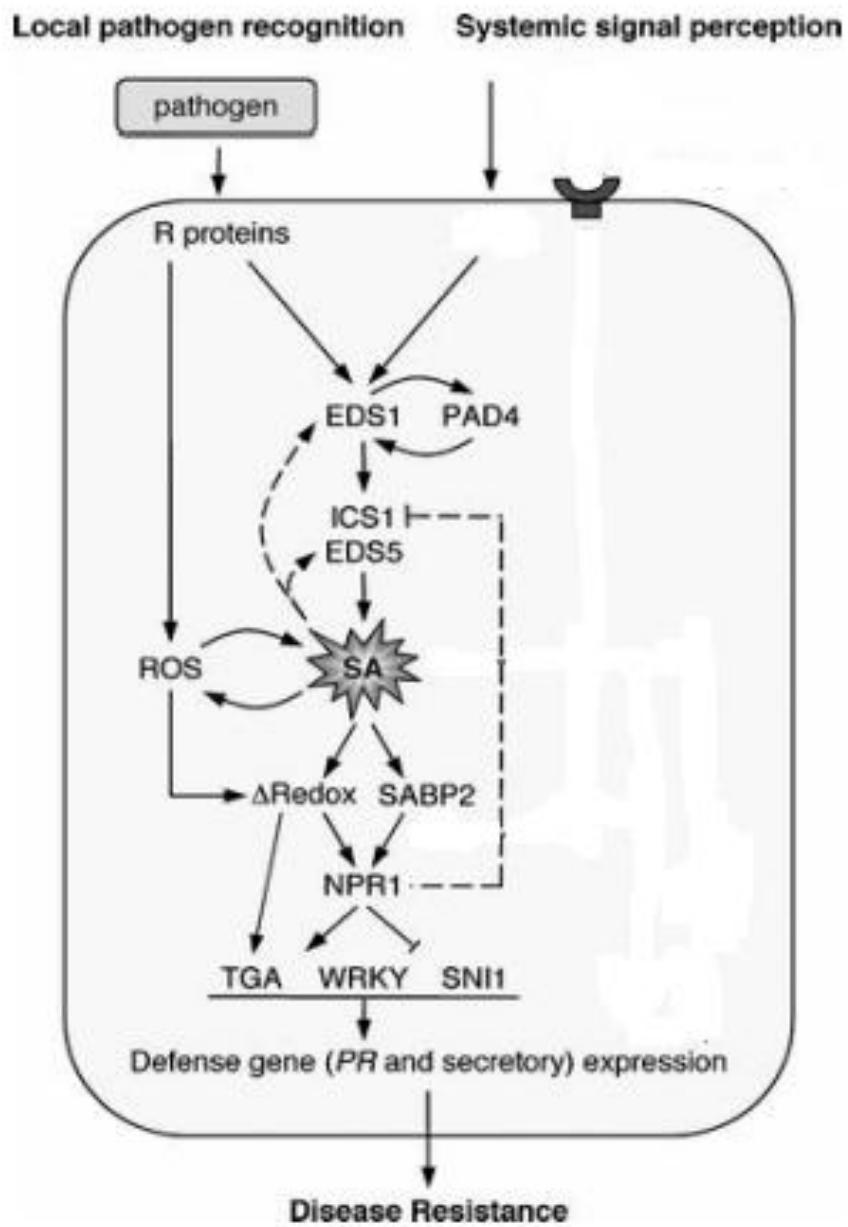


Figure 12: Les composantes majeures des voies de défense dépendantes du SA (Durrant and Dong 2004). ROS, formes actives de l'oxygène; SABP2, protéines 2 portant le SA; TGA, protéines portant le facteur TGA; WRKY, facteurs de transcription contenant le domaine WRKY; EDS1, enhanced disease susceptibility 1; PAD4, phytoalexin deficient 4; ICS1, isochorismate synthase 1; EDS5, enhanced disease susceptibility 5; NPR1, non expresser of PR genes; SNI1, suppressor of npr1 inducible 1; PR, pathogenesis-related genes.

Les évènements moléculaires associés à la SAR sont de mieux en mieux connus. Ainsi, la transmission du signal émis suite à la perception de l'agent infectieux repose sur différentes voies dans lesquelles l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène jouent un rôle crucial (Glazebrook et al., 2003). En effet, il a été rapporté que l'établissement de la SAR est généralement accompagnée par une augmentation de l'acide salicylique endogène (Malamy et Klessig, 1992 ; Dorey et al., 1997; Loake et Grant, 2007). En plus, l'application exogène de l'acide salicylique est susceptible d'induire la SAR (Kessmann et al., 1994 ; Lawton et al., 1996). Les plantes transgéniques exprimant le transgène bactérien NahG codant pour la salicylate hydroxylase qui dégrade le SA, présentent une diminution de la résistance à Pseudomonas et sont incapables de développer la SAR (Boisson and Meinnel, 2003; Delaney et al., 1995). Par ailleurs, l'expression massive du gène NPR1 améliore la résistance des plantes vis-à-vis de divers agents pathogènes indiquant que les protéines NPR1 sont nécessaires à l'établissement de la SAR (Freidrich et al., 2001). Les protéines NPR1 interagissent avec des facteurs de transcription qui activent les gènes impliqués dans la SAR (Zhang et al. 1999; Mou et al., 2003; Wang et al. 2005).

2.4. Le mode d'action du SA

Différents niveaux d'intervention du SA ont été décrits (Vasyukova et Ozeretskovskaya, 2007).

- Le SA active l'expression des gènes intervenant dans la défense des plantes (Vasyukova et al., 1999). Plusieurs PR protéines « pathogens related proteins » induites par le SA ont des activités antimicrobiennes, c'est le cas des chitinases et de la β 1-3 glucanase (Mauch et al., 1988; Salzman et al., 1998). D'autres appartiennent à la famille des PR-1, elles ont une activité inhibitrice de la croissance mycelienne (Niderman et al., 1995; Rauscher et al., 1999) et pourraient avoir un rôle dans l'établissement de la SAR (Cameron et al., 1999).
- Le SA a aussi la capacité de lier des enzymes comme les catalases, les ascorbates peroxydases et les aconitases (Farmer et al., 1998; Zhang et al., 1998; Cao et Dong, 1998; Mikolajczyk et al., 2000). La capacité du SA d'inhiber la catalase (enzyme qui détoxifie le peroxyde d'hydrogène) pourrait prolonger la demi vie de H_2O_2 et conduirait à l'amplification du stress oxydatif (burst oxydatif) à l'origine du déclenchement des réactions de la défense locale (Mehdy, 1994 ; Levine et al., 1996; Chen et Klessig, 1991; Panina et al., 2004; Ruffer et al., 1995)
- le SA interviendrait aussi comme molécule de signalisation susceptible de migrer dans les vaisseaux de la plante, et conférer une immunité à distance aux tissus de la plante dans la

SAR (Raskin, 1992, Chen et al., 1993). Cependant, il a été rapporté que le SA ne serait pas le signal mobile de la SAR mais qu'il est nécessaire pour son établissement (Vernooij et al., 1994). D'autres molécules notamment l'acide jasmonique et l'éthylène interviendraient dans la signalisation aboutissant aux réactions de défense. Ces molécules agiraient indépendant ou en synergie avec la voie de le SA.

3. La résistance systémique induite (ISR) et les voies de signalisation du contrôle biologique des maladies des plantes

3.1. Les agents de biocontrôle et la résistance systémique induite

L'emploi de microorganismes du sol, non pathogènes, en tant qu'agent de biocontrôle des maladies des plantes est une alternative prometteuse aux pesticides chimiques. Cette technologie permet de protéger les plantes contre les pathogènes sans pour autant nuire aux équilibres écologiques des écosystèmes. Les agents de biocontrôle peuvent agir directement sur les phytopathogènes (compétition, antagonisme) ou indirectement en stimulant la défense des plantes hôtes. L'expression de cette défense est communément appelée résistance systémique induite (ISR), elle se fait de manière systémique par tous les organes de la plante contre divers pathogènes. Certains agents de biocontrôle sont susceptibles de stimuler la croissance des plantes, ils sont désignés sous le nom de PGPRs (pour Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Mercado-Blanco and Bakker, 2007). Les PGPRs stimulent l'ISR induite aussi bien chez les dicotylédones que chez certaines monocotylédones. Les microorganismes susceptibles d'induire l'ISR sont divers, nous citons pour exemple les ascomycètes (*Trichoderma*), les bactéries du genre *bacillus* (*Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*) (Kloepper et al., 2004) et les bactéries du genre *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *Berkoldeira cepacia*) (Bakker et al., 2007). La ISR est peu spécifique, le PGPR *Pseudomonas fluorescens* 89-B-61, permet de diminuer l'incidence des maladies provoquées par *Fusarium oxysporum* et *Colletotrichum orbiculare* aussi bien chez le concombre que chez la tomate (Bais et al., 2006 ; Yan et al., 2002).

3.2. L'ISR et la transmission du signal de l'immunité systémique des plantes

L'effet protecteur de l'ISR est similaire à celui établi par la SAR, cependant, au contraire de la SAR, la ISR ne provoque pas de symptômes visibles de maladie (Van Loon et Bakker, 2005). Les trois étapes principales de la résistance sont retrouvées : la perception des molécules produites par l'agent de biocontrôle ou élicitation; la transmission d'un signal

systémique dans la plante et l'expression des mécanismes de défense (Ongena et Thonart, 2006).

Trois molécules sont actuellement reconnues pour leur implication dans la transduction de la signalisation en relation avec l'ISR, l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET). Même si l'AS est généralement associé à l'établissement de la SAR, son implication dans l'ISR a été aussi montrée dans certaines interactions plantes-pathogènes. C'est le cas du tabac et de la tomate chez qui, une accumulation de SA suite au traitement par *Pseudomonas aeruginosa*, a été noté (Höfte and Bakker, 2007). Ryu et al., (2003) ont rapporté que la souche *Bacillus pumilus* SE34 était susceptible d'assurer, chez *Arabidopsis*, une protection contre *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* utilisant une voie de signalisation dépendante du SA. Cependant, dans nombreuses interactions plante-pathogène, la signalisation de l'ISR est indépendante du SA mais dépend plutôt de l'acide jasmonique (JA) et de l'éthylène (ET) (figure 13). Quelques études ont rapporté que la signalisation par JA et par ET opèrent souvent de façon synergique pour activer l'expression de gènes de défense suite à une inoculation avec un agent pathogène (Glazebrook, 2005; Thomma et al., 2001). Chez le mutant *Arabidopsis* NahG, incapable d'accumuler l'AS, la souche *Pseudomonas fluorescens* WCS417 a assuré une protection contre *Pseudomonas syringae* (Pieterse et al., 2002). Cette protection n'a pas été obtenue chez les mutants d'*Arabidopsis* jar1 ou etr1 déficients respectivement dans les voies de signalisation associées à l'acide jasmonique et à l'éthylène. Cette voie de signalisation dépendante de l'acide jasmonique et de l'éthylène a été aussi rapportée chez les mutants NahG de tomate inoculés par *Bacillus pumilus* SE34 ou par *Pseudomonas fluorescens* 89B61 (Yan et al., 2002).

Par ailleurs, il a été rapporté que l'expression du gène NPR1, chez *Arabidopsis*, est nécessaire pour l'induction de l'ISR (Pieterse et al., 1998). Ainsi, la protéine NPR1 pourrait intervenir aussi bien dans les voies de signalisation associées à la SAR que celles associées à l'ISR.

3.3. Interaction entre les différentes voies de signalisation

La communication entre les voies de signalisation permet de minimiser les dépenses énergétiques des plantes et crée un réseau flexible visant l'ajustement de la défense aux pathogènes (Pieterse et al., 2001; Kunkel et Brooks, 2002).

Un des meilleurs exemples de communication associée à la défense est l'interaction entre les voies de JA et celles de SA (Kunkel et Brooks, 2002; Glazebrook et al., 2003; Beckers et Spoel, 2006; Koornneef et Pieterse, 2008; Spoel et Dong, 2008). La plupart des interactions entre SA et JA consistent en une relation antagoniste (Spoel et al., 2003). Cependant, il faut

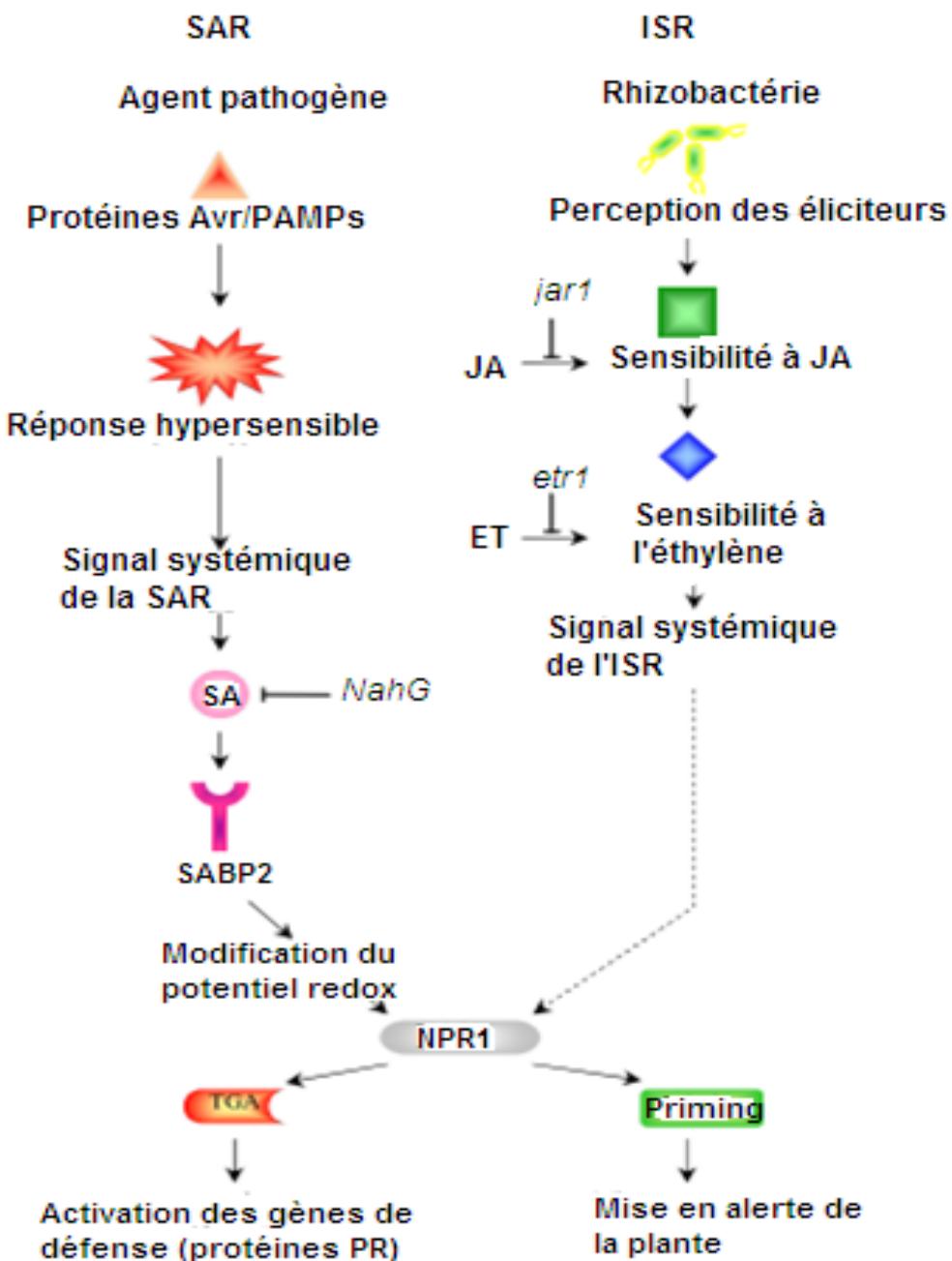


Figure 13: Voies de transduction impliquées dans la résistance systémique induite par un pathogène (SAR) et par une rhizobactérie (ISR). La reconnaissance des protéines d'avirulence et éventuellement des PAMPs (Pathogen associated molecular patterns), provoque une réaction hypersensible (HR) au niveau du site d'infection. Un signal est ensuite transmis à l'ensemble de la plante via une voie dépendante de l'acide salicylique (SA). Celui-ci activerait la protéine SABP2 (SA-binding protein) et provoquerait une modification du potentiel redox dans le cytoplasme. Ceci agirait sur NPR1 qui s'associerait avec le facteur de transcription TGA pour initier la transcription des gènes de défense. Dans le cas de l'ISR induite par des rhizobactéries non pathogènes, la reconnaissance des éliciteurs activerait une voie de transduction dépendante de l'acide jasmonique (JA) et de l'éthylène (ET). La voie de signalisation de L'ISR converge ensuite vers celle de la SAR au niveau de la protéine NPR1, qui en plus de l'activation des gènes défense, aboutirait à une mise en alerte de la plante, ou priming.

noter que des gènes peuvent être induits par une application exogène de SA et de JA (Schenk et al., 2000). Le blocage de la voie SA par les mutations sid1 et sid2 se traduit par une augmentation de la production de JA après une inoculation par Pseudomonas, suggérant une interaction antagoniste entre SA et JA (Heck et al., 2003). De même, NPR1, une composante de la voie SA, joue un rôle important dans les interactions SA-JA (Spoel et al., 2007). Les régulations croisées négatives ou positives entre les voies du SA et du JA seraient dépendantes de la spécificité de l'agent pathogène et viseraient l'ajustement des réponses de la plante au type d'agresseur (Adie et al., 2007).

IV. Les outils de la défense des plantes

Trois types d'outils ont été décrits dans la réponse des plantes aux agents pathogènes, la production de métabolites secondaires à activité antimicrobienne (les phytoalexines), le renforcement de la paroi cellulaire et la synthèse des protéines de défense. Ces réponses sont souvent précédées par une réaction hypersensible dont le but serait de confiner le pathogène au site d'infection, afin de permettre aux autres moyens de défense de la plante de se mettre en place.

1. La réaction d'hypersensibilité

La HR est l'un des mécanismes de défense des plantes les plus efficaces. Elle est généralement associée à la résistance spécifique de type hôte mais aussi à certains types de résistance non-hôte. La découverte de la capacité des cellules mortes d'induire, lors de la HR, la synthèse par les cellules avoisinantes de phytoalexines antifongique, a constitué la première étape de la compréhension du mode d'opération de cette réponse (Hargreaves et Bailey, 1978). Deux rôles sont attribués à la HR. D'une part, la mort des cellules végétales entourant l'agent pathogène perturberait considérablement le développement de ce dernier. D'autre part, la HR jouerait un rôle de signal d'alarme, informant les autres parties de la plante de l'attaque parasitaire. Une des preuves du contrôle génétique de la HR est l'existence de mutants «lésions spontanées» (LMM, Lesion Mimic Mutants). Certains de ces mutants sont capables de présenter des zones nécrotiques de type HR sans qu'ils soient infectés par des pathogènes. Chez la majorité de ces LMM, l'apparition des lésions s'accompagne de l'expression constitutive des marqueurs de défense, comme l'accumulation de composés phénoliques, le dépôt de callose, la production des ROS (Jabs et al., 1996; Torres et al., 2002), l'expression de gènes de défense ainsi que la production de phytohormones telles que SA, JA et ET (Bouchez et al., 2007; Greenberg, 2000; Lorrain et

al., 2004). Cette accumulation, indique que la mutation correspondante est liée aux mécanismes de défense (Lorrain et al., 2003; Shirasu and Schulze-Lefert, 2003). Une certaine analogie a été établie entre la mort cellulaire hypersensible et la mort cellulaire programmée (PCD) ou apoptose décrite chez les animaux. Cette idée est renforcée par la révélation de certains marqueurs de l'apoptose, notamment la fragmentation de l'ADN nucléaire, dans certains cas de HR (Ryerson and Heath, 1996). Par ailleurs, il a été révélé que la mort cellulaire hypersensible implique souvent la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Heath, 2000). Les ROS sont susceptibles de dégrader les acides gras insaturés des lipides membranaires à la suite de leur peroxydation (Blokhina et al. 2003), ce qui conduit à la dégradation des membranes cellulaires. Cet effet est associé à une altération de l'activité respiratoire au niveau de la membrane interne des mitochondries, ainsi qu'à une perte d'électrolytes par la membrane plasmique conduisant enfin à la mort cellulaire (Scandalios, 1993). Les ROS sont aussi suspectés dans la fragmentation de l'ADN nucléaire (Becana et al., 1998) et la dénaturation des protéines (Sreenivasulu et al., 2000).

2. La paroi végétale

La paroi végétale, à base de fibres de cellulose, est un ensemble moléculaire dynamique comprenant des structures complexes de polysaccharides, des composés phénoliques et des protéines structurales (figure 14) (Farrokhi et al, 2006). Elle constitue une barrière physique à la pénétration des agresseurs qui pour la contourner, ont développé différentes stratégies notamment la production d'enzymes hydrolytiques dégradant la paroi végétale (Walton, 1994; Idnurm and Howlett, 2001). Les défenses de la plante comprennent un ensemble de mécanismes conduisant à modifier et à renforcer la paroi contre les dégradations enzymatiques générées par les pathogènes. Ils incluent la production de glycoprotéines riche en hydroxyprolines (Benhamou, 1996), le dépôt de la callose et la synthèse des composés polyphénoliques tels que la lignine (Boudart et al., 1995).

Les glycoprotéines riche en hydroxyprolines ont été décrites chez le melon en réponse à l'inoculation par *Colletotrichum lagenarium* (Esquerré-Tugayé, 1973), ces molécules sont aussi induites dans d'autres interactions plantes-pathogènes (Esquerré-Tugayé et al. 1979). Elles jouent un rôle dans l'organisation de la paroi primaire et servent comme point d'initiation de la polymérisation de la lignine (Bolwell et al., 1995).

La lignification permet de renforcer la paroi végétale la rendant plus résistante aux attaques des enzymes hydrolytiques des agents pathogènes (Kawasaki et al, 2006 ; Hückelhoven, 2007). Une corrélation a pu être établie entre la lignification et la résistance aux maladies, les

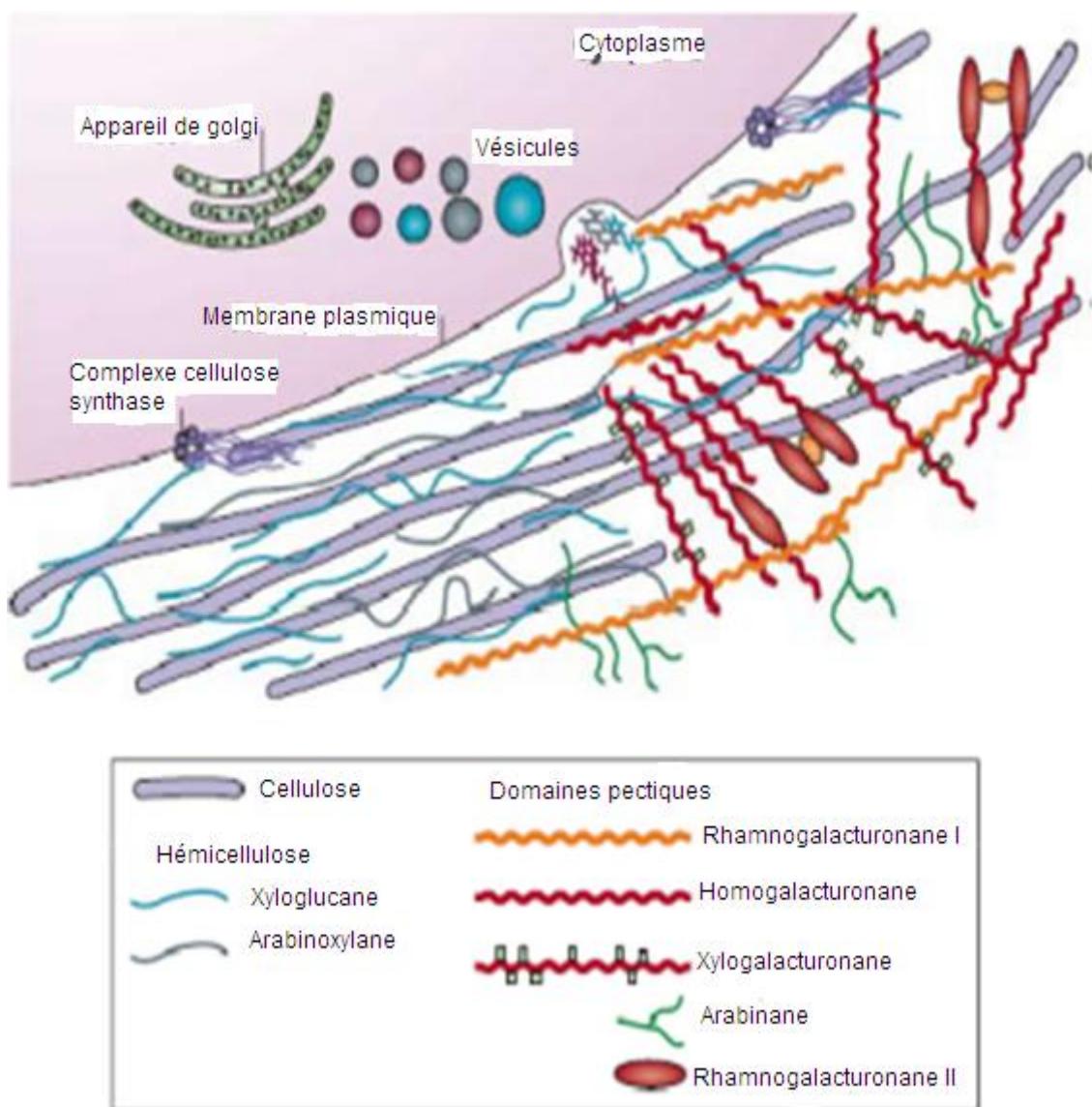


Figure 14 : Structure de la paroi primaire des cellules végétales (Cosgrove, 2005)

plantes résistantes montrent une augmentation du dépôt de lignine plus importante que celle des plantes sensibles (Soylu, 2006). Les ROS semblent intervenir dans le déclenchement de la lignification de la paroi favorisant, via l'activité peroxydase, les liaisons entre les composés pariétaux et les monomères de lignine (De Gara et al. 2003; Torres et al. 2006). Cet épaisseissement dépendant de l'accumulation des ROS a aussi été observé en réponse aux traitement par le SA et par le chitosan (Masuta et al., 1991).

La callose, un constituant des appositions pariétales (CWA) (pour « cell wall apposition »), a été considérée comme un facteur important dans la résistance à la pénétration des agents pathogènes (Brown et al. 1998). Des plantes NaHG d'*Arabidopsis*, incapable d'accumuler l'acide salicylique, ont montré une réduction de dépôt de callose tout autour du haustorium de *Perospora parasitica* (Donofrio and Delaney, 2001). Ces mutants ont montré une sensibilité accrue envers les pathogènes, suggérant que le dépôt de la callose est influencé par le SA. Cependant, un mutant d'*Arabidopsis* déficient dans la callose synthase n'a pas montré de sensibilité accrue vis à vis des attaques parasites, compromettant le rôle de la callose dans la défense des plantes.

3. Stimulation du métabolisme secondaire : cas particulier du métabolisme phénolique

3.1. Des métabolites secondaires antimicrobiens

Les plantes ont acquis la capacité de synthétiser et d'accumuler un nombre élevé de petites molécules de structure variée, connues sous le nom de métabolites secondaires. Ils sont des molécules qui ne participent pas directement au développement des plantes mais plutôt interviennent dans les relations avec les stress biotiques, abiotiques ou améliorent l'efficacité de reproduction.

Ils proviennent habituellement d'acides aminés ou d'autres produits du métabolisme primaire. Certains de ces composés possèdent une activité antimicrobienne et sont de véritables outils de la défense des plantes contre les agents pathogènes (Hammerschmidt, 1999; Mansfield, 2000; Dixon, 2001). Ces composés peuvent être préexistants et sont appelés phytoanticipines (VanEtten et al, 1994) ou nouvellement synthétisés en réponse à une infection microbienne, ils sont alors désignés des phytoalexines (Paxton, 1981). La nature des phytoalexines est spécifique de l'hôte et indépendante de l'agent pathogène (isoflavonoïdes chez les Légumineuses, sesquiterpénoïdes chez les Solanacées). Chaque espèce végétale possède sa phytoalexine spécifique particulière (la resveratrol pour la vigne). Cependant, tous les pathogènes ne manifestent pas la même sensibilité vis-à-vis des phytoalexines, le mildiou du piment est dix fois moins sensible que le mildiou de la pomme de terre au capsidiol

(Gianinazzi *et al*, 1991). La plupart des phytoalexines sont des composés phénoliques qui dérivent des voies de biosynthèse des phénylpropanoides (figures 15) (Dixon, 2001).

3.2. Les métabolites phénoliques et la résistance aux maladies des plantes

a. La voie des phénylpropanoïdes et la synthèse des composés phénoliques

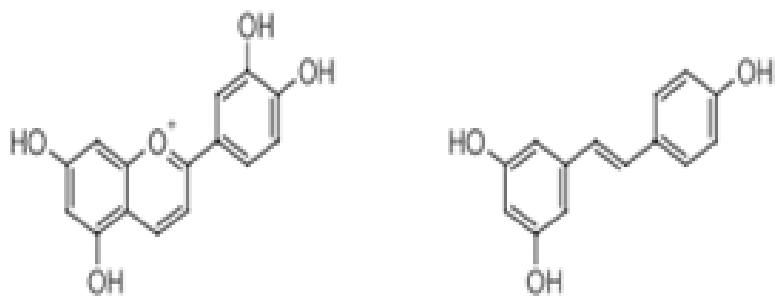
Les composés phénoliques sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs cycles aromatiques comportant un ou plusieurs groupements hydroxyles. Ils sont classés selon le nombre de carbones par molécule et selon la structure du squelette de base (Harborne, 1989). La plupart des composés phénoliques sont connus pour leur implication dans la défense des plantes. Ceci concerne les acides hydroxybenzoïques, les acides hydroxycinnamiques, les coumarines, les flavonoïdes et les stilbènes (Grayer et Harborne, 1994). La majorité de ces composés phénoliques proviennent des voies des phénylpropanoïdes formés à partir de l'acide trans-cinnamique à la suite de la désamination de la phénylalanine par la phénylalanine ammonia-lyase (PAL). L'acide t-cinnamique est ensuite hydroxylée par l'acide cinnamique 4-hydroxylase (C4H) pour donner l'acide p-coumarique. Ce dernier est converti ensuite en p-coumaroyl Coenzyme A par l'enzyme 4-coumarique- CoA ligase (4CL).

Les phénylpropanoïdes simples présentent un squelette en C6-C3. Ces sont des acides hydroxycinnamiques (figure 5) provenant de l'acide p- coumarique ou du p-coumaroyl-CoA. C'est le cas des acides cafériques, féruliques, 5-hydroxyféruliques et sinapiques. Ces acides sont généralement conjugués avec des sucres ou des acides organiques pour donner des esters, le sinamoyl choline, un ester de l'acide sinapique, a été identifié dans les racines de certaines plantes (Ruegger and Chapple, 2001).

Plusieurs phénylpropanoïdes induits lors d'un stress possèdent un squelette de type C6-C3-C6 caractéristique des flavonoïdes. Ces dernières sont synthétisées par la chalcone synthétase qui condense le p-coumaryl-CoA et trois molécules de malonyl-CoA.

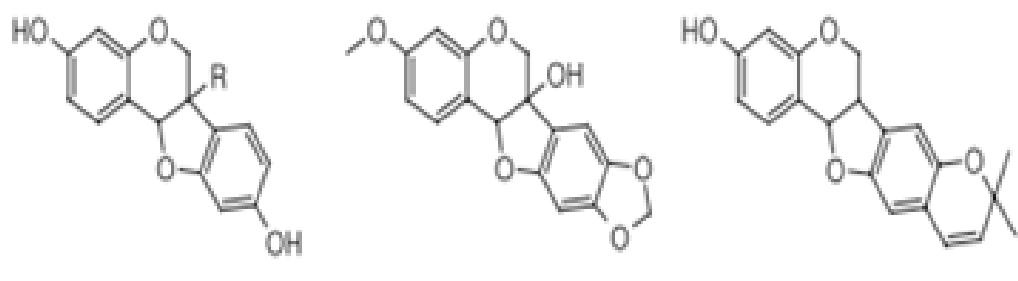
Les coumarines constituent une autre classe des phytoalexines dérivés de la phénylalanine, ils comportent la scopolétine induite dans l'hévéa (Churngchow and Rattarasarn, 2001) et dans le tabac (Costet *et al.*, 2002) après infection par des agents pathogènes.

La stilbène est un composé phénolique de type C6-C2-C6, il est synthétisé par la stilbène synthase qui condense un p-coumaroyl-CoA et trois résidus malonyl-CoA (Schröder et Schröder, 1990., Tropf *et al*, 1994). Le resvevératol est le représentant principal de cette classe, il est induit dans plusieurs espèces comme la vigne ou l'arachide (Langcake and Pryce, 1976 ; Sobolev *et al.*, 1995).



3-Deoxy-anthocyanidine

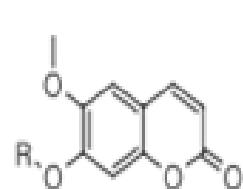
Resvératrol



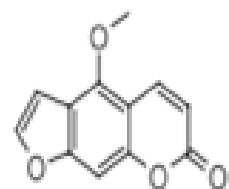
**Glycinol R=OH
Médicarpine R=H**

Pisatine

Phaséoline



**Scopolétine R=H
Scopoline R= D-Glc.**



Bergaptène

Figure 15 : Quelques phytoalexines de nature phénoliques

La lignine est un polymère complexe formé à partir d'un mélange de phénylpropanoïdes simples. La lignification consiste en une déshydrogénéation enzymatique suivie d'une condensation des alcools coumariques, conifériques et sinapiques. La lignine est liée de manière covalente à la cellulose, à l'hemicelluloses, et avec les glycoprotéines pariétales éventuellement les protéines riches en hydroxyproline.

b. Rôle des composés phénoliques dans la défense constitutive

Les premiers travaux qui ont mis en évidence le rôle des composés phénoliques constitutifs dans la défense des plantes reviennent à Walkers (Walker, 1925; Walker et al, 1929). Ils ont montré que la résistance de l'oignon à la maladie causée par *Colletotrichum circinans* est corrélée avec la pigmentation du bulbe. Les extraits aqueux de ces bulbes inhibent la croissance de ce pathogène et déforment son tube germinatif. Les analyses de ces extraits ont révélé que l'activité antimicrobienne de ces extraits est due à deux composés phénoliques simples, le catéchol et l'acide procatéchique. Par la suite, il a été montré que la plupart des plantes possèdent des composés phénoliques préformés ayant une activité antimicrobienne et pouvant jouer un rôle dans la résistance aux maladies (Nicholson and Hammerschmidt, 1992; Grayer et Harborne, 1994; Treutter, 2005, 2006). Le 3-hydroxyacétophénone et le triglycoside du kaempferides sont des composés phénoliques qui ont été associés à la résistance de l'œillet au *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Curir et al., 1996 ; 2001). Dans la pêche, la résistance à la pourriture brune a été corrélée avec la production des acides cholorogénique et caféïque. Ces composés phénoliques interviendraient en inhibant les enzymes nécessaires à la pénétration du pathogène à travers la cuticule des fruits (Bostock et al., 1999).

c. Rôle des composés phénoliques dans la défense induite

Dans la plupart des interactions plantes-pathogènes, les réactions de défense sont induites après l'infection par des pathogènes (Hammerschmidt et Nicholson, 1999). La première phytoalexine phénolique a été caractérisée vers la fin de l'année 1950 (Cruickshank, 1963), il s'agit de la pisatine, un dérivé isoflavonoïde isolé à partir de petits pois immatures inoculés avec des spores d'une espèce avirulente de *Monilinia*. Dans les années subséquentes beaucoup de phytoalexines ont été découvertes (Cruickshank, 1963; Hammerschmidt, 1999), plusieurs de ces composés sont de nature phénolique (Dixon and Paiva, 1995). Un des meilleurs exemples permettant de localiser *in vivo* les phytoalexines et de les quantifier, est apporté par

le travail de Nicholson et al., (1987) sur la résistance du sorgho à certains champignons pathogènes. Ces auteurs ont constaté que le sorgho produit une variété de phytoalexines de type flavanes-3-ol qui sont également des pigments, ce qui permet leur visualisation dans les tissus et leur quantification par l'utilisation de la microscopie optique et de la microspectrophotométrie (Nicholson et al., 1987; Hipskind et al., 1990; Lo et al., 1999). Nicholson et al., (1987) ont pu montrer que ces composés s'accumulent au niveau du site de l'infection, tout juste après la pénétration de l'agent pathogène. Les concentrations obtenues dans les cellules infectées étaient largement suffisantes pour inhiber la croissance du pathogène (Snyder et Nicholson, 1990; Snyder et al, 1991).

McNally et al. (2003) ont pu suivre, dans le pathosystème *Podosphaera xanthii*-concombre, la production de la cucumerin B, un flavonoïde autofluorescent en fonction du développement de l'agent pathogène. Ils ont démontré que l'accumulation de ces phytoalexines autofluorescentes n'est réalisée que dans l'épiderme des plantes résistantes et ceci corrélativement avec l'effondrement de l'agent pathogène.

3.3. Protéines de défense, cas particulier des peroxydases

L'arsenal défensif des plantes comprend de nombreuses protéines de défense induites après l'infection par des agents pathogènes (Van Loon et al., 2006). Les premières protéines de défense découvertes sont des PR-protéines (Pathogenesis Related proteins), détectées dans des feuilles de tabac à la suite de leur infection par le virus de la mosaïque du tabac (TMV) (Gianinazzi et al., 1970; Van Loon et Kammen, 1970).

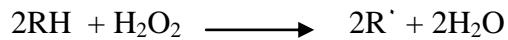
Les protéines de défense peuvent agir directement sur l'agent pathogène ou indirectement en générant des éliciteurs susceptibles de stimuler la défense de la plante hôte (Kombrink and Somssich, 1997). Plusieurs familles de protéines de défense peuvent être considérées, les plus étudiées sont :

- Des enzymes du métabolisme secondaire (phénylpropanoïdes, lignines)
- Des enzymes de détoxication (peroxidase, catalase...)
- Des enzymes hydrolytiques (chitinases, glucanases...)
- Les protéines PR

Les protéines PR sont des protéines de défense induites dans les plantes hôtes en réponse à une infection pathologique, elles sont susceptibles de s'accumuler localement au niveau du site de pénétration de l'agent pathogène, mais aussi de manière systémique par des organes loin du site de l'infection (Scherer et al., 2005). Le terme de protéines PR regroupe toutes les protéines induites par des microorganismes mais aussi leurs homologues enzymatiques tels

que la phénylalanine ammonia-lyase, les peroxydases et les polyphénoloxydases, qui sont présentes dans les plantes constitutivement mais augmentent pendant les infections par les pathogènes (van Loon et al., 2006). 17 familles de protéines PR sont classées selon leurs propriétés biochimiques et biologiques (van Loon et al., 2006) (Tableau 2) . Certaines de ces protéines PR sont des hydrolases, telle que les chitinases (PR63, PR64, PR8, PR11) (Simmons, 1994; Rohini et Rao, 2000) et les glucanases (PR-2) (Grover et Gowthaman, 2003) capables de dégrader directement les parois fongiques, d'autres comme les PR-5 peuvent désorganiser la membrane plasmique du pathogène (Anzlovar et Dermastia, 2003), réduisant ainsi l'infection par les agents pathogènes (Van Loon et al., 2006). Les protéines PR sont très stables et résistante à l'action des protéases de la plantes hôte et des agents pathogènes (Kauffmann et al., 1999). Elles peuvent être induites de façon spécifique par les voies de signalisation hormonale de la plante, les PR-1, PR-2 et les PR-5 sont induites par le SA (Durrant et Dong, 2004).

Par ailleurs, les peroxydases sont largement connues pour leur rôle central dans la défense des plantes hôte contre les pathogènes nécrotrophes ou biotrophes (van Loon et al., 2006). Ce sont des enzymes à hème susceptibles de catalyser des réactions d'oxydation de divers substrats en utilisant le H₂O₂:



Certaines peroxydases appartiennent à la sous-famille des PR-protéines 9 (van Loon et al. 2006), et sont susceptibles de limiter la propagation de l'infection en renforçant les parois des cellules végétales et en générant des ROS hautement toxiques aux agents pathogènes (Passardi et al., 2005). L'activité peroxydase est induite par des champignons (Sasaki et al., 2004), des bactéries (Lavania et al, 2006) et des virus (Diaz-Vivancos et al., 2006). Les peroxydases sont impliquées dans divers processus en liaison avec la défense des plantes, probablement en raison du nombre élevé des isoformes enzymatiques et aussi à la polyvalence des réactions catalysées par ces isoenzymes (Passardi et al., 2005). Elles interviennent dans la réticulation des constituants de la paroi cellulaire, dans la synthèse de phytoalexines et dans le métabolisme des ROS (figure 16). Elles sont souvent induites en réponse aux molécules de signalisation impliquées dans la défense des plantes comme le SA, le JA ou Et (El-Sayed et Verpoorte, 2004).

Tableau 2 : Les familles de protéines PR (van Loon et al., 2006).

Famille de protéines		Activité biologique défensive
PR-1	V5/Tpx-1/Sc7	?
PR-2	β -1,3-glucanase	Attaquent les polysaccharides de la paroi de l'agent pathogène
PR-3	Chitinases classe I, II, IV, V, VI, VII	Attaquent la chitine (champignons, insectes, nématodes) Synergie avec les β -1,3-glucanase.
PR-4	Chitinases classe I, II	Activité lectine (inactivation de glycoprotéines)
PR-5	Thaumatin-like	Perméabilisation de la membrane fongique Résistance au choc osmotique et au froid
PR-6	Thaumatin-like	Inhibiteurs de protéases
PR-7	Subtilisin-like protéase	Endoprotéase Dissolution de la paroi de l'agent pathogène
PR-8	Chitinases classe III	Activité chitinase et/ou lysozyme
PR-9	Peroxydases	Détoxification du peroxyde d'hydrogène Synthèse de lignine
PR-10	Bet v 1-like	Activité ribonucléase ? Transport de stérols, de cytokines
PR-11	Chitinases classe I	Endochitinases
PR-12	Défensines	Antimicrobiens
PR-13	Thionines	Membranotoxines (perméabilisation) Antimicrobiens
PR-14	LTP (protéines de transfert lipidique)	Transport de lipides Protection de la membrane (cutine, subérine) Antimicrobiens
PR-15	Germine oxalate oxydases	Superoxyde dismutase
PR-16	Oxalate oxydases	Superoxyde dismutase
PR-17	PRp27	?

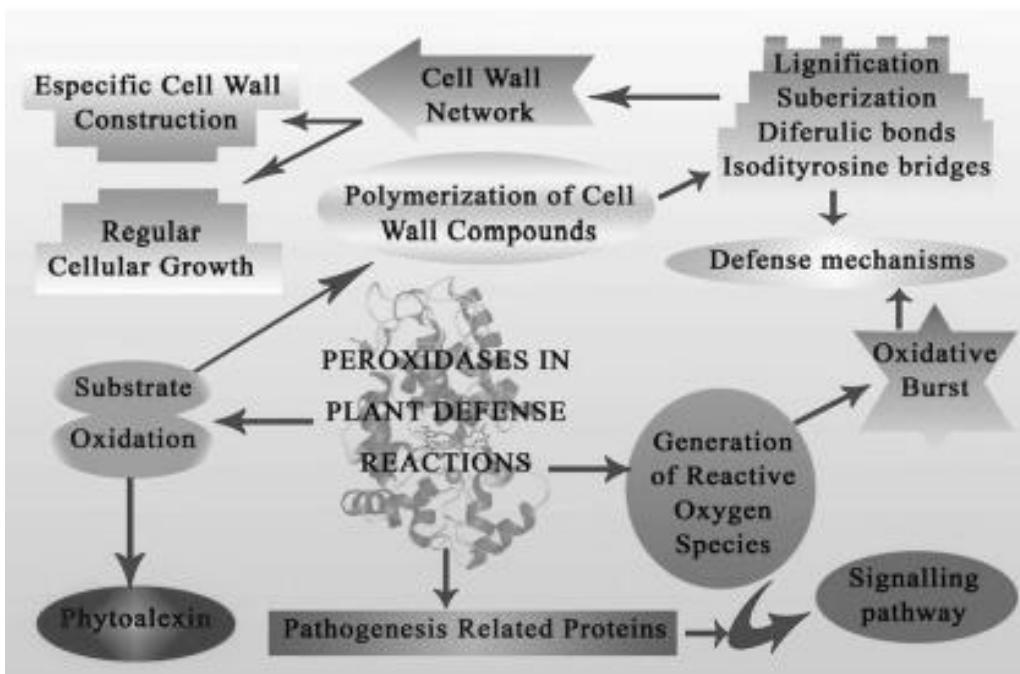


Figure 16: Rôles des peroxydases dans les réactions de défense des plantes (Almagro et al., 2009). Les peroxydases interviennent dans la défense des plantes contre les pathogènes car elles peuvent constituer des PR-protéines comme elles peuvent intervenir dans le renforcement de la paroi végétale en établissant des liaisons entre ses différents composants. Elles interviennent aussi dans la synthèse des phytoalexines et des formes actives de l'oxygène, créant ainsi un environnement toxiques aux agents pathogènes.

I. Le matériel végétal, le pathogène et les agents de biocontrôle

1. Matériel végétal

Les plantes utilisées sont issues de graines de deux variétés du palmier dattier, Jihel "JHL, hautement sensible à la maladie de Bayoud et "Bousthami noir "BSTN, résistante. Les graines sont désinfectées par l'hypochlorite de sodium à 20% pendant 20 minutes puis rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile. La germination est réalisée à 38°C à l'obscurité dans la vermiculite humidifiée préalablement stérilisée à 180°C pendant trois heures. Après apparition de la radicule, les graines sont mises dans des pots contenant la tourbe et le sable (v/v ; 1/1) stérilisés. La culture est réalisée sous une température de 25°C et une photopériode de 16 heures d'éclairage, jusqu'au stade d'expérimentation (plantules avec deux à trois feuilles) (Figure 1).



Figure 1 : Plantules du cultivar Jihel de palmier dattier âgées de 6 mois (2 à 3 feuilles)

2. Le pathogène

Le pathogène est la souche ZAG du champignon *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa), connue pour son agressivité. Il est isolé à partir des rachis de palmes d'arbres atteints du Bayoud apportés de la palmeraie de Draâ dans la région de Zagora au sud du Maroc (El Idrissi-Tourane, 1997). La culture du Foa est réalisée sur des milieux semi-solides comme le milieu malt-agar ou le milieu PDA (potato-dextrose agar) (figure 2a) et des milieux liquides comme le milieu PDB (potato-dextrose broth) et le milieu SDB (Sabouraud Dextrose Broth) (Annexe 1).

L'inoculum est apporté sous forme d'une suspension de microconidies et macroconidies (10^6 conidies.ml $^{-1}$) (figure 2b) préparée à partir du milieu solide et ajustée par l'eau distillée stérile à la concentration désirée.

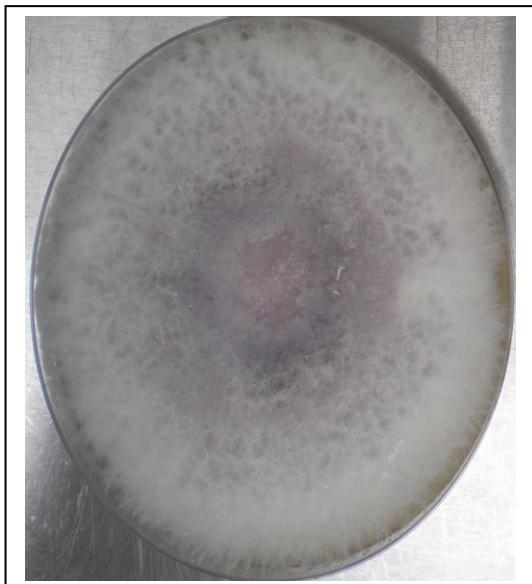


Figure 2a : culture du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* sur le milieu PDA

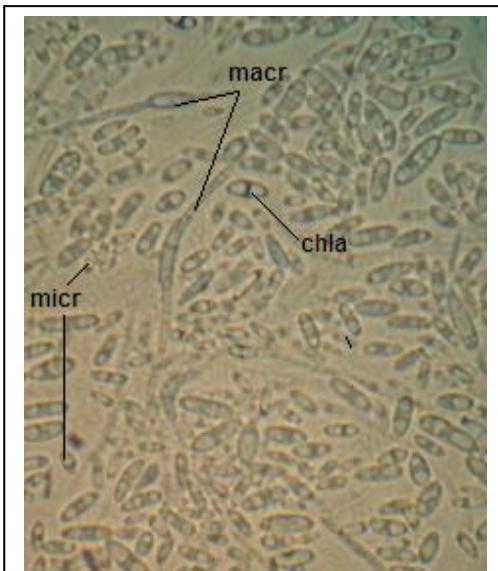


Figure 2b : les conidies du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* sous microscope optique ($\times 400$) ; micr: microconidies, macr: macroconidies, chla : chlamydospores.

3. Les agents de biocontrôle

3.1. Les bactéries testées pour le contrôle biologique de la maladie du Bayoud

Deux bactéries, *Burkholderia cepacia* Cs5 (Cs) et *Bacillus amyloliquefaciens* Ag1 (Ag), sont testées pour leur utilisation possible dans le contrôle biologique de la maladie de Bayoud. Les deux bactéries utilisées proviennent du Laboratoire des Biopesticides, Centre de Biotechnologie de Sfax, Tunisie. Elles ont été isolées à partir de la rhizosphère des amandiers (Kelani-Feki et Jaoua, 2011), et stockées à -20°C dans une solution stérile du glycérol à 20%.

3.2. Sélection de microorganismes antagonistes du Foa à partir du « compost » de grignon d'olives en vue de leur utilisation dans le contrôle biologique de la maladie du Bayoud.

Une tonne et demi du grignon provenant des oliviers d'Ait ourir (région de Marrakech) est arrosé et brassé à raison de deux fois par semaine pendant une année. Deux grammes de ce grignon sont ensuite broyés dans 100 ml d'eau physiologique stérile (NaCl à 9g/l) puis centrifugés à 600 g pendant 15 minutes à température ambiante. Le surnageant est récupéré puis dilué plusieurs fois dans l'eau physiologique stérile. Ces dilutions sont ensuite utilisées pour réaliser des cultures dans des milieux différents (gélose nutritive, PDA) dans le but d'isoler des microorganismes à partir du « compost » du grignon.

La culture des microorganismes est réalisée dans les milieux solides GN (gélose nutritives), SDA (Sabouraud Dextrose Agar), PDA (Potato-Dextrose Agar) et dans les milieux liquides PDB (Potato-Dextrose Broth) et SDB (Sabouraud Dextrose Broth) (Annexe 1).

II. Tests de confrontation et d'antagonisme

1. Antagonisme en milieu solide

L'antagonisme a été évalué par co-culture du Foa avec chacun des microorganismes testés (bactéries provenant de la Tunisie, bactéries et champignons isolés à partir du compost de grignon d'olives). L'inhibition de la croissance du pathogène a été déterminée sur le milieu PDA (potato-dextrose agar). Dix µl de la suspension bactérienne ajustée à 10^{10} CFU.ml⁻¹ sont placés au centre des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. Deux disques de 5mm de diamètre d'une culture active de Foa sont placés à 2cm de part et d'autre de la culture bactérienne (figure 3a). Un troisième disque de la culture active de Foa est placé dans une autre boîte de Pétri comme témoin (figure 3b).

Les cultures sont par la suite incubées à l'obscurité à 28 ±2°C. Le degré d'inhibition de la croissance est évalué par la mesure de la longueur de la colonie du côté de la culture bactérienne (ou fongique) par comparaison avec le témoin.

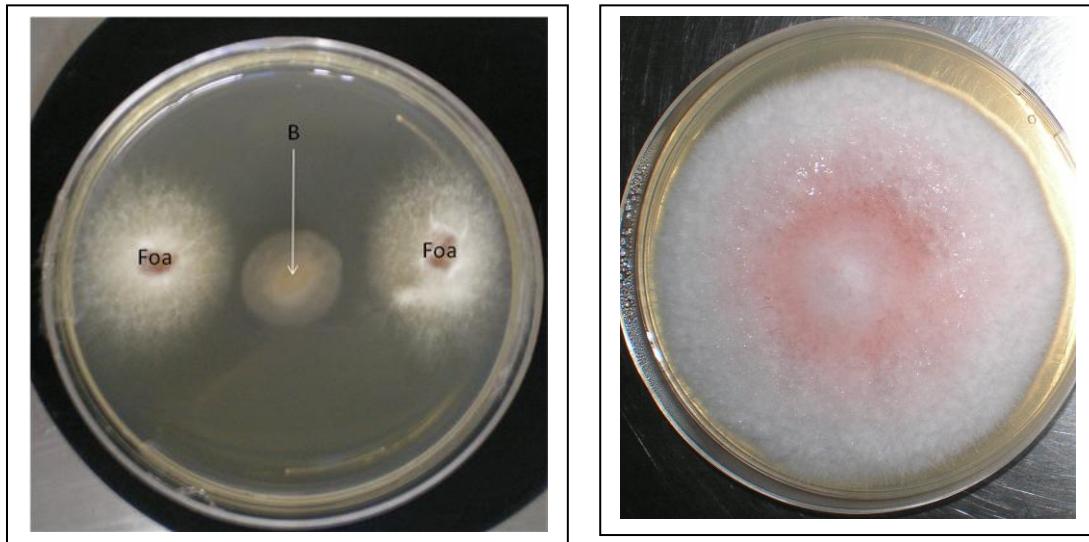


Figure 3a : Co-culture de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa) et des bactéries (B) antagonistes en milieu PDA

Figure 3b : *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* en milieu PDA

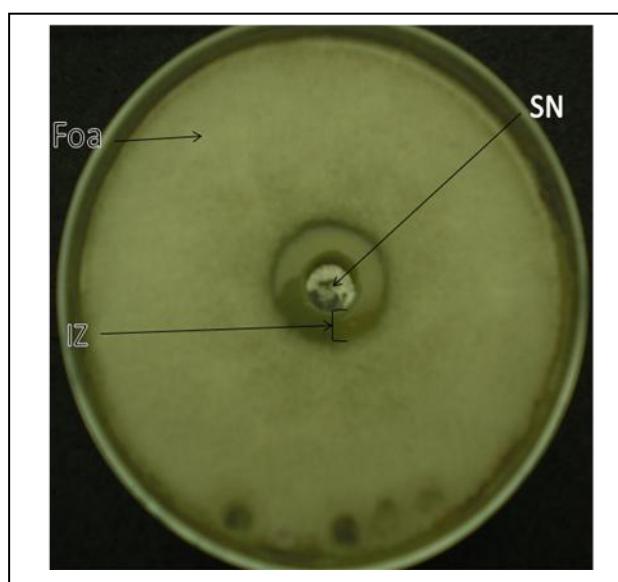


Figure 4 : Effet du surnageant (SN) des bactéries sur la culture du Foa ; Foa : *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, IZ : zone d'inhibition

2. Antagonisme en milieu liquide

L'inhibition de la sporulation du Foa a été évaluée dans un milieu PDB (potato-dextrose broth). Dix μL de la suspension bactérienne ajustée à $10^{10}\text{CFU.ml}^{-1}$ et $10\mu\text{L}$ de la suspension fongique du Foa ajustée à $10^6\text{spores.ml}^{-1}$ sont placés dans des erlens contenant le milieu liquide PDB et incubés sous agitation à $28 \pm 2^\circ\text{C}$. La sporulation du Foa est déterminée sous microscope en utilisant une lame Malassez, elle est exprimée en nombre de conidies par millilitre.

3. Effets des bactéries sur la structure du mycélium du Foa

Après sept jours de co-culture en milieu PDB, le mycélium du Foa est monté entre lame et lamelle et examiné à l'aide d'un microscope optique. Les altérations engendrées par les bactéries antagonistes sont caractérisées par rapport à la structure du Foa en monoculture.

4. Effet du surnageant des bactéries sur la croissance du Foa

Les cultures bactériennes en milieu liquide PDB ont été centrifugées à 8000 g pendant 20 minutes et le surnageant a été collecté. Un volume de $50\mu\text{l}$ d'une suspension fongique a été étalé sur la surface du milieu PDA dans des boites de Pétri. Par la suite un puits de 5mm de diamètre a été creusé au centre de ces boites et rempli par $100\mu\text{l}$ du surnageant bactérien (figure 4). Ces boites sont ensuite incubées à $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durant 2 jours et l'étendue de la zone d'inhibition est mesurée.

III. Traitements des plantes et leur inoculation par le pathogène

1. Traitement des plantes par l'acide salicylique

Les plantules au stade d'expérimentation (2 à 3 feuilles) sont trempées, pendant une période variable entre 3 et 10 jours, dans des solutions d'acide salicylique ($50\mu\text{M}$ et $100\mu\text{M}$) (figure 5) avant leur injection par le pathogène. L'inoculum est constitué d'une suspension conidienne de Foa ($10^6\text{ spores.ml}^{-1}$). Dix μl de cette suspension sont injectés au niveau de la racine principale à 2cm du collet (figure 6). Les plantules témoins sont injectées par $10\mu\text{l}$ d'eau distillée stérile. Quatre traitements sont considérés :

- Les plantules traitées par le SA sans être infectées par Foa (TU),
- Les plantules traitées par le SA et inoculées par Foa (TI),
- Les plantules inoculées par Foa et non traitées par le SA (UI),
- Les plantules non traitées par le SA et non inoculées par Foa (UU).



Figure 5 : plantules de palmier dattier trempées dans des solutions d'acide salicyliques

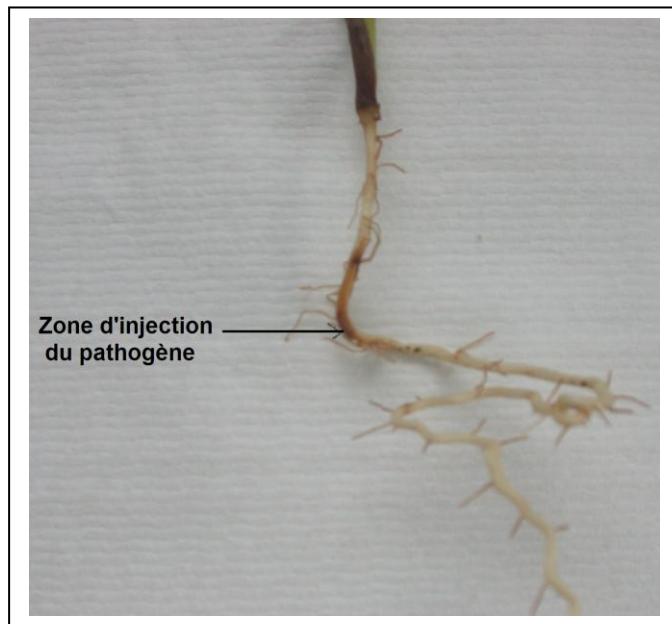


Figure 6 : zone d'injection du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*

2. Traitement des plantes par les bactéries, agents du contrôle biologique

Les suspensions bactériennes sont préparées avec l'eau distillée stérile et ajustées à 10^{10} CFU.ml⁻¹; 30µl de ces suspension sont injectés dans la racine principale à 2 cm du collet. Les plantules sont par la suite transférées dans des erlens contenant de l'eau distillée stérile et incubées à 25°C dans une chambre de culture avec une photopériode de 16 heures. Après trois jours les plantules sont inoculées avec 30µL d'une suspension fongique de Foa (10^6 spores.ml⁻¹). Les plantules témoins sont injectées par l'eau distillée stérile.

Nous avons effectué six traitements :

F : plantules inoculées par Foa,

Ag : plantules injectées par *Bacillus amyloliquefaciens*,

AgF : plantules injectées par *B. amyloliquefaciens* et inoculées avec Foa,

Cs : plantules injectées par *Bulkholderia cepacia*,

CsF : plantules injectées par *B. cepacia* et inoculées par Foa,

O : plantules témoins.

3. Evaluation de la protection du palmier contre le Bayoud

La protection du palmier dattier conférée à la suite du traitement par l'acide salicylique a été évaluée par la détermination du taux de survie des plantules traitées et inoculées par le pathogène en comparaison avec les témoins non traités et inoculés. Cette procédure nécessite d'attendre, chez les témoins inoculés, l'apparition des symptômes de la maladie se caractérisant par le ramollissement des racines, l'enroulement des feuilles qui finissent par se dessécher et flétrir annonçant la mort de la plante. Une autre alternative d'évaluer le degré de protection du palmier dattier contre le Bayoud a été utilisée dans le cas du contrôle biologique. Il s'agit de mesurer la taille de la zone de brunissement développée autour de la zone d'inoculation du pathogène. Lorsque cette zone est réduite et tend vers une nécrose localisée, la plante se porte bien et parvient à résister au pathogène. Alors que, la propagation du brunissement traduit la colonisation de la plante par le pathogène.

IV. Analyses biochimiques

1. Analyse des composés phénoliques et détermination de l'activité Phénylalanine ammonia-lyase

1.1. Extraction et dosage des composés phénoliques solubles

L'extraction des composés phénoliques est réalisée selon la méthode décrite par Ziouti et al. (1992) (figure 7). 400 mg du matériel racinaire pris tout autour du site de l'infection sont

broyés à 4°C dans 2 ml de méthanol 80 %. L'homogénat est mis en agitation pendant 10 min, puis centrifugé trois fois de suite à 7000 g pendant 3 min. Le surnageant est récupéré à chaque fois et l'extrait obtenu est évaporé sous vide à une température de 35° C à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu phénolique est récupéré dans du méthanol pur et le dosage est réalisé selon la technique de Folin-Ciocalteu (El Hadrami et al., 1997). Le dosage repose sur la capacité que possèdent les composés phénoliques à réduire les complexes ioniques polymériques formés à partir des acides phosphomolybdiques et phosphotungstiques (réactif de Folin-Ciocalteu). Un volume de 100µl du surnageant est ajouté au réactif de Folin-Ciocalteu, un complexe bleu se forme, il est stabilisé par l'addition de carbonate de sodium à 20%. L'absorbance est lue à 760 nm et la teneur des composés phénoliques solubles est exprimée en mg-équivalent de catéchine par gramme de matière fraîche.

1.2. Extraction et dosage des composés phénoliques pariétaux

Le résidu solide obtenu après extraction des phénols solubles est lavé trois fois avec le méthanol pur puis hydrolysé à 100°C en présence de HCl 6N pendant 2 heures. Les phénols pariétaux sont solubilisés par l'éther diéthylique. Ce dernier est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif et les composés phénoliques sont repris dans du méthanol pur et dosé comme décrit pour les phénols solubles (figure 7).

1.3. Analyse des composés phénoliques par HPLC

L'analyse des composés phénoliques est réalisée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC, Waters 600E équipé d'un détecteur à barrettes de diode Waters 990 et d'un logiciel pour le traitement des données). La séparation est réalisée par un gradient d'acétonitrile de 5% à 80% sur une colonne C18 à polarité de phase inversée. Les composés phénoliques sont identifiés sur la base de leur temps de rétention et leur spectre d'absorption en comparaison avec des standards.

1.4. Activité phénylalanine ammonia-lyase (PAL)

a. Obtention de l'extrait enzymatique

Les tissus racinaires sont broyés dans 1ml du tampon phosphate de potassium pH 7.0 contenant le polyvinylpyrrolidone. L'homogénat est centrifugé à 10000 g pendant 30 min, le surnageant constitue l'extrait enzymatique. Toutes ces étapes sont réalisées à 4°C et la teneur des protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) utilisant l'albumine pour la réalisation de la gamme étalon.

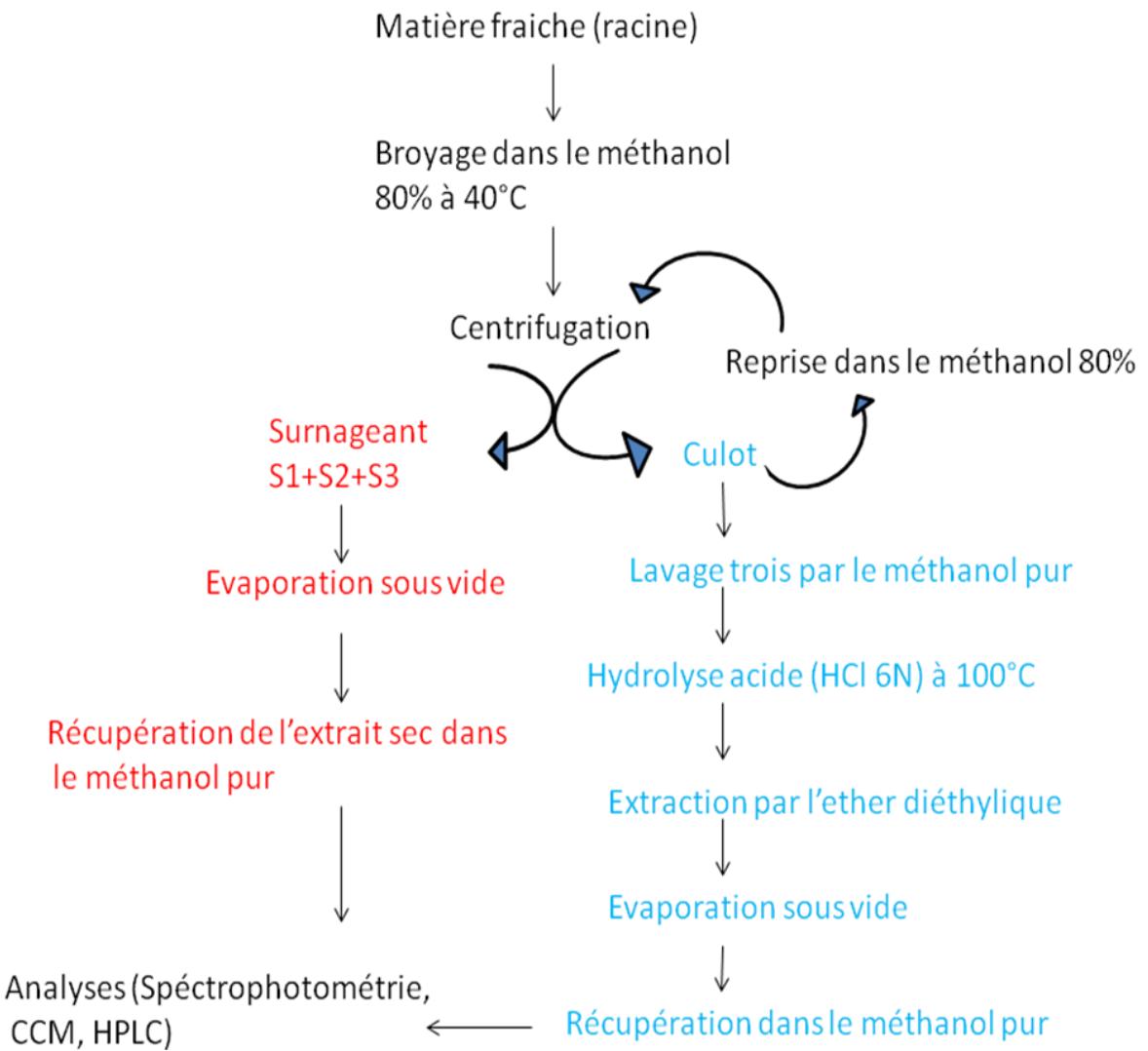


Figure 7 : Protocole d'extraction des composés phénoliques solubles (en rouge) et pariétaux (en bleu) des racines du palmier dattier.

b. Détermination de l'activité PAL

La phénylalanine ammonia-lyase est l'enzyme qui catalyse la première réaction du métabolisme phénolique. Elle transforme la phénylalanine en acide cinnamique. La détermination de l'activité PAL est réalisée à 290 nm par mesure de l'acide cinnamique produit à partir du L-phénylalanine. Le mélange réactionnel est composé du tampon Tris-HCl 0,5M pH 8.0, 200µl du L-phénylalanine 10mM et 200µl de l'extrait enzymatique. L'incubation se fait à 37°C durant une heure et la réaction est stoppée par 0,05ml d'HCl 5N. L'activité PAL est exprimée en unités enzymatiques par mg de protéines totales.

2. Les composantes du stress oxydatif « burst oxydatif »

2.1. Activité catalase

L'activité catalase est déterminée par mesure de la décomposition de H₂O₂ selon Kato et Shimizu (1987). Le mélange réactionnel est constitué de 0,9 ml de l'extrait enzymatique (paragraphe IV.1.4.a) et de 0,1 ml du tampon phosphate de potassium 10 mM pH 7.0. La réaction est déclenchée par addition de 50µl d'H₂O₂ 3%. L'activité catalase est déterminée à 240nm en utilisant le coefficient d'extinction de H₂O₂ (40 mM⁻¹.cm⁻¹). Elle est exprimée en unité enzymatique par mg de protéine.

2.2. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

La teneur de H₂O₂ est déterminée selon Sergiev et al. (1997). Le matériel végétal (500 mg des tissus racinaires) est broyé à froid dans 2 ml d'une solution d'acide trichloroacétique (TCA) 0,1%. Après centrifugation à 10000 g pendant 20 minutes, 0,5 ml du surnageant est ajouté à 0,5 ml du tampon phosphate de potassium 10mM (pH 7) et 1 ml d'une solution 1M du KI. L'absorbance est mesurée à 390 nm et la teneur en H₂O₂ est déterminée à l'aide d'une gamme étalon réalisée dans les mêmes conditions.

2.3. La peroxydation des lipides

La peroxydation des lipides est évaluée par mesure du malonyldialdéhyde (MDA) comme décrit par Rusterucci et al. (1996). Les tissus racinaires (500 mg) sont broyés à froid dans 2 ml du TCA 0,1%. Après centrifugation à 10000 g pendant 20 min, 0,5 ml du surnageant est ajouté à 1 ml de l'acide thiobarbiturique (TBA) 0,5% préparé dans le TCA à 20%. L'incubation est réalisée dans l'eau bouillante pendant 30 min puis la réaction est stoppée par refroidissement dans la glace. Les échantillons sont de nouveau centrifugés 5 min à 10000 g et l'absorbance du surnageant est lue à 532 nm. La valeur de l'absorbance non spécifique lue

à 600 nm est soustraite de celle déterminée à 532 nm. La teneur en peroxydes des lipides est calculée en utilisant le coefficient d'extinction du MDA ($155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

3. L'activité peroxydase

3.1. Détermination de l'activité peroxydase

L'extrait enzymatique est obtenu comme c'est décrit dans le paragraphe IV.1.4.a. L'activité peroxydase est évaluée à 470 nm en utilisant le gaïacol comme donneur d'hydrogène. Le mélange réactionnel est composé du tampon phosphate de potassium 10 mM (pH 7.0) et du gaïacol 25 mM. La réaction est déclenchée par addition de 20µl de H_2O_2 à 10%. L'activité peroxydasique est calculée en utilisant le coefficient d'extinction du téragaïcol ($26,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), elle est exprimée en unité enzymatique par mg de protéines.

3.2. Analyse qualitative de l'activité peroxydase

L'analyse qualitative de l'activité peroxydase est réalisée par électrophorèse sur gel acrylamide-bisacrylamide (30-0,8) comme décrit par Baaziz (1989). Le tampon de l'électrophorèse est constitué du Tris-Glycine-SDS (TGS) pH 8.3. La migration est réalisée sur un gel de 10cm/10cm durant 2 à 4 heures à 10°C et sous un courant constant de 60 mA. La révélation des peroxydases est réalisée à température ambiante en utilisant la benzidine et le peroxyde d'hydrogène 1% dans un tampon acétate 0.2M, pH 5.

V. Les analyses microscopique et histochimique

1. Analyses histochimiques

1.1. Marquage des protéines

Les racines sont fixées toute la nuit à 4°C dans une solution de glutaraldéhyde (1%)-paraformaldéhyde (2%)-caféine (1%) préparée dans un tampon phosphate 0,2M pH 7.2 (Annexe 2). Les échantillons sont déshydratés à 4°C dans une série de bains d'éthanol de degré croissant en éthanol. L'imprégnation est faite par immersion des échantillons dans un bain de résine/éthanol 100° (v/v) pendant deux heures puis dans un bain d'historesine polyméthylméthacrylate pendant 24 heures. L'inclusion se fait à 37°C dans le même milieu d'imprégnation auquel est ajouté un durcisseur (dérivé d'acide barbiturique). Les coupes semi-fines de 3 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome, elles sont sujettes à une double coloration à l'acide Périodique-Schiff (APS) (Martoja et Martoja, 1967) et au Naphtol Blue Black (NBB) (Fisher, 1968) (Annexe 2). L'APS colore en rose les parois cellulaires et les réserves amyloacées tandis que le NBB colore spécialement les

protéines en bleu foncé. Les échantillons sont traités par l'acide périodique (1%) pendant 5 min. Après lavage, ils sont colorés par le réactif de Schiff à l'obscurité sous une température ambiante pendant 10 min. Les échantillons sont par la suite trempés dans un bain d'eau sulfureuse pendant 2 min puis de nouveau lavés à l'eau courante. Après, ils sont colorés par le Naphtol blue blacks pendant 5 min puis lavés rapidement à l'eau courante puis traités par l'acide acétique à 7 % pendant 1 min. Les échantillons colorés sont séchés puis montés entre lame et lamelle pour l'observation microscopique.

1.2. Histolocalisation des composés phénoliques

Les fragments de racines du palmier dattier sont imprégnés par l'agarose 3% puis coupés à l'aide d'un microtome en coupes fines. L'observation est réalisée par un microscope équipé d'un filtre bleu (excitation à 420nm) et d'un filtre barrière (515-560nm). Les coupes sont immergées pendant 2 à 5 minutes dans le 2 amino-éthylphénylborinate à 1% dans le méthanol (réactif de NEU) spécifique des composés phénoliques (Neu, 1957). Le montage entre lame et lamelle est fait dans un mélange glycérine-eau (15/85, v/v) et l'observation est réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence. En présence du réactif de NEU et sous la lumière bleue, les dérivés des acides cafériques deviennent jaunes verdâtres alors que les flavonoïdes apparaissent oranges brillants.

1.3. Histolocalisation de l'activité peroxydase

Le marquage histologique de l'activité peroxydase est réalisé selon le protocole décrit par Gahan (1984). Les coupes fines des racines du palmier dattier sont fixées 1 heure dans le paraformaldéhyde à 4% dans le tampon phosphate de potassium 0,2M pH 7.2. La coloration est réalisée avec le diaminobenzidine (DAB) $1,4 \cdot 10^{-3}$ M dans un tampon Tris-HCl 0,05M pH7.6 en présence de H_2O_2 1% et du 3 amino-1,2,4-triazol 10^{-1} M. L'observation est réalisée à l'aide d'un microscope optique.

2. Immunohistolocalisation des polysaccharides pariétaux

2.1. Au niveau des cellules bordantes du palmier dattier

L'observation des cellules bordantes a été réalisée au niveau des pointes des jeunes racines du palmier dattier après 3 semaines de germination dans la vermiculite humide. La variété utilisée est JHL hautement sensible à la maladie du Bayoud.

L'observation est effectuée soit au niveau des coupes longitudinales de l'apex racinaire du palmier dattier, soit sur des cellules isolées de la pointe de ces mêmes racines. Des colorations au calcofluore, au rouge de ruthénium et à la calcéine sont réalisées.

La calcofluore révèle les beta-glucanes (y compris la cellulose) qui apparaît fluorescente sous microscope à fluorescence. Le rouge de ruthénium colore en rouge les pectines acides de la paroi. La calcéine caractérise les cellules vivantes qui apparaissent fluorescentes en vert. En plus de ces colorations, des molécules pariétales ont été localisées utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques (Willats et al., 2001). Les cellules bordantes sont fixées dans le formaldéhyde à 4% (dans le tampon PIPES pH 7) durant 2h à 4°C. Après rinçage avec le tampon PIPES (1,4-piperazinediethanesulfonic acid), les lames sont ensuite recouvertes par une solution d'albumine (bovin serum albumine ou BSA) à 1% dans le tampon PBS (tampon phosphate salin) pH 7,2 (Annexe3). L'excès en BSA est éliminé par rinçage avec une solution de PBST (le Tween 20 utilisé est à 0,05% dans le PBS). Les lames sont ensuite recouvertes par une solution d'anticorps monoclonaux spécifiques puis incubées toute la nuit à 4°C. Après rinçage, les lames sont recouvertes par l'anticorps secondaire conjugué à la fluorescéine et incubées à 37°C pendant 2 heures. Après rinçage dans le PBST, les lames sont montées dans le citifluor pour l'observation microscopique.

Quatre anticorps monoclonaux ont été testés, ils proviennent tous du rat.

LM8 spécifique du xylogalacturonane

LM15 spécifique du xyloglucane

JIM 13 spécifique des Arabinogalactanes protéines (AGPS)

LM1 spécifique des Extensines

L'observation est réalisée à l'aide d'un microscope à épifluorescence et les images sont obtenues à l'aide d'une camera Leica DFC 300 FX.

2.2. Au niveau des racines du palmier dattier

Des coupes des racines du palmier dattier sont réalisées à l'aide d'une lame de rasoir près de la zone d'injection de l'agent pathogène. Après fixation 30 minutes dans le paraformaldéhyde (4%) et le glutaraldéhyde (1%) dans un tampon PIPES (50mM) pH 7 contenant le CaCl₂ (1mM), les coupes des racines sont lavées dans le tampon PIPES (50mM) et incubées pendant 30 minutes dans une solution de blocage formée de BAS à 1%. Après rinçage avec le PBST les coupes sont incubées à 4°C dans des solution d'anticorps primaires pendant toute la nuit, puis rincées de nouveau avec le PBST avant d'être incubées de nouveau avec l'anticorps

secondaire couplé avec la fluorescéine. Après un autre rinçage avec le PBST les coupes sont montées dans la citifluor puis observées sous microscope à épifluorescence.

Quatre anticorps monoclonaux ont été testés, les LM15, JIM 13, LM1, LM8 proviennent du rat alors que le CCRM7 provient de la souris

LM15 spécifique du xyloglucane

JIM 13 et le CCRM7 spécifiques des Arabinogalactanes protéines (AGPS)

LM1 spécifique des Extensines

LM8 spécifiques des Xylogalacturonanes

3. Caractérisation Ultrastructurale de l'interaction palmier dattier-Foa

L'analyse structurale des racines du palmier dattier est réalisée à l'aide d'un microscope électronique à transmission (Joel 100 EX-Tokyo, Japon). La préparation des tissus racinaires passe par plusieurs étapes :

La pré-fixation des échantillons pendant 12 heures à température ambiante dans le glutaraldéhyde à 3% (v/v) préparé dans le tampon cacodylate de sodium 0,1M pH 7,2. Après rinçage dans des bains du tampon cacodylate de sodium, les échantillons sont fixés pendant 2 heures à l'obscurité par immersion dans une solution de tétraoxyde d'osmium (1%) préparé dans le tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH 7,2. Par la suite, les échantillons sont déshydratés dans une série de bains d'éthanol de degré croissant jusqu'à 100% d'éthanol. L'imprégnation et l'inclusion des tissus se fait progressivement dans la résine (Spurr's low viscosity epoxyresin). Les coupes ultrafines sont réalisées par un microtome Reichert-Ultracut S, elles sont contrastées à l'obscurité par l'acétate d'uranyle 2% pendant 30 min puis par le citrate de plomb pendant 30 min avant la réalisation des observations sous microscope électronique à transmission.

VI Analyse statistique

Résultats	Nombre de plantes utilisées	Analyse statistique
Publication 1	100 plantes, deux répétitions (50 plantes par répétition)	ANOVA
Publication 2	168 plantes, 42 plantes par traitement, trois répétitions	ANOVA SPSS
Publication 3	13 séctions par traitement, deux répétitions	Chi-square SPSS
Publication 4	120 plantes, 20 plantes par traitement, 4 répétitions	ANOVA SPSS

RESULTATS

Chapitre 1: L'induction du métabolisme phénolique par l'acide salicylique en relation avec la résistance du palmier dattier au *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*

Présentation de la publication 1

Effect of salicylic acid on phenolic compounds related to date palm resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*

Phytopathol. Mediterr. (2003). 42, 9–16

L'acide salicylique (SA) est connu pour son intervention dans les voies de signalisation associées à la défense des plantes contre les agents pathogènes, et l'établissement de la résistance est souvent accompagné par un niveau élevé en SA endogène. De plus, il a été rapporté dans plusieurs pathosystèmes que le traitement des plantes par le SA engendre l'expression des mêmes gènes que ceux qui sont exprimés à la suite des attaques parasitaires. Dans cette étude nous avons traité des plantules de palmier dattier par le SA en vue d'activer leur système de défense contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa) l'agent responsable de la maladie du Bayoud. Nous avons en particulier examiné l'effet du SA sur les composés phénoliques des racines du palmier dattier en relation avec leur inoculation par Foa. Ce choix est en partie justifié par le rôle que les composés phénoliques jouent dans le renforcement des parois des cellules végétales bloquant ainsi la progression de l'agent pathogène, mais aussi par leur activité antifongique, mise en évidence, *in vitro*, vis-à-vis du Foa. La concentration 50µM du SA a été choisie car elle a donné les meilleurs résultats en améliorant, de plus que la moitié, le taux de survie des plantules inoculées par le pathogène. Ce résultat est vrai aussi bien pour les plantules issues des graines du cultivar Jihel du palmier dattier, un cultivar hautement sensible à la maladie de Bayoud, que pour le cultivar Boushami noir qui lui est résistant. Cette amélioration semble être liée à la stimulation de la synthèse des composés phénoliques solubles car leur teneur a montré une augmentation significative, par rapport aux plantes témoins, après traitement des plantules par le SA (6 fois et 4 fois plus importante pour les cultivars sensible et résistant respectivement. Les phénols liés aux parois des cellules végétales ont été aussi examinés, leur teneur est plus importante dans les racines du cultivar résistant que dans celle du cultivar sensible avec une légère augmentation notée pour les deux cultivars à la suite du traitement par l'acide salicylique. Lorsqu'on a examiné le profil phénolique des phénols solubles par HPLC, nous avons pu mettre en évidence que

l'application de l'acide salicylique à des racines inoculées par le pathogène, a engendré la synthèse de composés phénoliques différents des acides cafféoylshikimiques normalement présents dans les racines du palmier dattier. Ces nouveaux composés phénoliques induits ont été identifiés comme des dérivés des acides hydroxycinnamiques et sont représentés essentiellement par les dérivés de l'acide p-coumarique et de l'acide sinapique. L'expression de ces composés phénoliques induits s'est faite de manière concomitante avec la diminution des acides cafféoylshikimiques constitutifs, ce qui nous a fait penser à la possibilité d'une conversion partielle de ces derniers en dérivés des acides hydroxycinnamiques. Par ailleurs, nous avons aussi noté que la résistance établie à la suite du traitement par le SA a été associée avec la formation d'une nécrose localisée rappelant la lésion normalement formée lors d'une réaction hypersensible. Dans le cas des plantules ayant montré les symptômes de la maladie, le brunissement, apparu au niveau du site d'inoculation du pathogène, s'étend sur toute la racine qui se ramollie et se vide de son contenu annonçant la mort de la plantule.

Les résultats obtenus dans ce travail permettent de conclure que l'inoculation des racines de palmier dattier par le pathogène stimule le métabolisme des composés phénoliques, surtout chez les plantes asymptomatiques. Ceci est vrai aussi bien pour le cultivar sensible que résistant. Cette stimulation est plus importante après traitement par le SA et plus évidente pour le cultivar sensible par rapport au cultivar résistant.

Effect of salicylic acid on phenolic compounds related to date palm resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*

ABDELHI DIHAZI, FATIMA JAITI, JAMILA ZOUINE, MAJIDA EL HASSNI and ISMAIL EL HADRAMI

Laboratoire de Physiologie Végétale, Equipe Biotechnologie et Physiologie Végétales, Département de Biologie, Faculté des Sciences Semlalia, B.P 2390, 40 000 Marrakesh, Morocco

Corresponding author: I. El Hadrami

Fax: +212 44 439997

E-mail: hadrami@ucam.ac.ma

Summary

Salicylic acid (SA) plays a key role in establishing resistance to pathogens in many plants. To study the possible involvement of SA in the resistance of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) to *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa), we investigated levels of phenolic compounds, known as indicators of resistance in the date palm/Fusarium pathosystem. After treatment with SA the content of root soluble phenolics in *F. oxysporum* inoculated date palm seedlings was about 4 times higher in cv. Bousthami noir and 6 times higher in cv. Jihel than that in untreated plants showing disease symptoms. The largest increase was at a SA concentration of 50 µM. SA treatment also enhanced the content of cell wall phenolics. In addition, inoculation of SA-treated roots of date palm with Foa (strain ZAG) resulted in a greater number of plants showing only limited hypersensitive reaction-like necrotic lesions. In contrast, SA-untreated plants normally showed spreading necrosis in response to fungus inoculation.

Key words: Bayoud, defence mechanisms, *Phoenix dactylifera*, Fusarium wilt, phytoalexins.

Introduction

Plants have evolved numerous mechanisms to defend themselves against pathogens. Some of these mechanisms are constitutive, while others are induced in response to pathogen attack. These induced defence mechanisms are activated at infection site, and manifest themselves in part as necrotic lesions (hypersensitive response, HR). Induced resistance also occurs in the distal uninfected parts of infected plants, leading to systemic acquired resistance (SAR) (Goodman and Novacky, 1994). Salicylic acid (SA) has been recognised as an important signal molecule indicating that plant defence has been activated against pathogens (Enyedi et al., 1992; Gaffney et al., 1993). SAR and local resistance are generally accompanied by

higher levels of endogenous SA (Malamy and Klessig, 1992; Dorey et al., 1997). SAR can also be induced by exogenous application of SA (Kessmann et al., 1994; Lawton et al., 1996). In tobacco, the same defence genes that were expressed upon infection with tobacco mosaic virus were also activated by treatment with SA (Ward et al., 1991). More recent results have shown that transgenic tobacco plants expressing bacterial salicylate hydroxylase, which metabolises SA, are unable to induce SAR, and even show enhanced susceptibility to pathogens (Gaffney et al., 1993). At the same time phenol metabolism is activated in plants reacting to pathogens (Ellard-Ivery and Douglas, 1996). This is due not only to the mechanical role that phenolics play in cell walls, but also to their antifungal properties (Harborne, 1991). New phenolics are synthetised in date palms (*Phoenix dactylifera* L.) following infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa), the agent causing Bayoud disease (El Hadrami et al., 1997). However, little is known about the effect of SA on phenol metabolism in relation to the resistance of date palm to Foa. The aim of this work was to determine the effect of SA treatment on phenol metabolism in relation to date palm resistance to Foa.

Materials and methods

Fungal and plant material

Fusarium oxysporum f. sp. *albedinis* conidia were harvested from infected date palm leaves brought from Zagora in the south of Morocco and germinated on malt-agar at 25°C in darkness. The inoculum was a conidial suspension of the ZAG strain known for its aggressiveness (El Idrissi Tourane et al., 1995). The conidial suspension was adjusted to 10^6 spores.ml⁻¹. Three-month-old date palm seedlings were obtained from seeds produced by mother cultivars highly susceptible to Foa wilt (Bayoud). They were grown in pots containing sand (75%) and peat (25%) in a greenhouse at 30°C, under a 16 h light/8 h darkness regime. The seedling roots of two date palm cultivars, susceptible Jihel (JHL) and resistant Bousthami noir (BSTN), were infected by injecting 10 µl of conidial suspension into the roots.

Effect of SA treatment on the content of soluble phenolics

In two separate experiments, the roots of three-month-old date palm seedlings of both cultivars were soaked in SA at various concentrations (1 mM, 0.2 mM, 0.05 mM). Control plants were treated with sterile distilled water. For the soluble phenolic contents, 30 date palm seedlings per cultivar were used at each SA concentration; an equal number of plants was

used for the control. Each value is the mean of two replicates (400 mg f wt of roots from 5 seedlings per replicate).

Effect of SA treatment on the survival of date palm seedlings

One hundred seedlings of each cultivar were treated with SA (50 µM) by soaking their roots in SA solution for 10 days before inoculation with one of the conidial suspensions. The control plants were inoculated but not treated with SA. The survival of seedlings was recorded one month after inoculation. The results were the mean of two repetitions with 50 plants for each repetition. The phenolic content of the seedling roots was also determined.

Extraction and quantification of soluble phenolic compounds

Levels of soluble phenolic compounds were determined according to Ziouti et al. (1992). Root tissues (400 mg from 5 plants), taken from around the infection sites, were homogenised in an ice bath with 2 ml (80%) methanol. The homogenate was centrifuged three times at 7000 g for 3 min; supernatants were recuperated each time. One hundred microlitres of the supernatant was added to Folin-Ciocalteu reagent and sodium carbonate. The mixture was incubated at 40°C for 30 min and the blue colour was read at 760 nm. The content of soluble phenolic compounds was determined for the experiments described above; it was expressed in mg-equivalents of catechin per g of f wt.

Extraction and quantification of cell wall phenolic compounds

The residue of tissue after soluble phenol extraction was washed three times with methanol and then incubated in the presence of 6N HCl at 100°C for 2 h. The cell wall phenolic compounds were extracted three times with diethyl ether. After evaporation of the diethyl ether, the phenolics were resuspended in 200 µl methanol. The cell wall phenolic content was determined as described for soluble phenolics.

Chromatographic analysis by TLC and HPLC

TLC was conducted on microcrystalline cellulose plates in the upper phase of BAW (butanol-acetic acid-water, 4:1:5 [v:v:v]). UV was used for phenolic detection with and without NH₃ vapour. Phenolic compounds were separated and identified by HPLC (El Hadrami et al., 1997) with a Waters 600 E liquid chromatograph (Waters Millenium, En Yvelines Cedex, France) equipped with a Waters 990 photodiode array detector.

Results

Effect of SA treatment on the survival of date palm seedlings

SA treatment enhanced the resistance of date palm to Foa. Without SA treatments, diseased control plants showed progressing wet necrosis of the roots earlier in the susceptible JHL cv. (4 days) than in the resistant BSTN cv. (8 days). One month after inoculation, 51% of the plants of the susceptible cultivar and 21% of the resistant cultivar had completely collapsed. In contrast, one month after SA treatment 24% of plants of cv. JHL and 9% of plants of cv. BSTN had died from Fusarium wilt (Table 1). SA-treated plants without disease symptoms generally developed limited necrotic lesions, which reflected a delay in the colonisation of the host plant by the pathogen.

Effect of SA on soluble phenolic compounds

The relation between SA and soluble phenolic compounds following SA treatments at 50 µM, 200 µM and 1 mM was studied in the roots of the date palm cv. JHL and BSTN. For cv. JHL (Fig. 1), treatment with a low SA concentration (50 µM) enhanced the content of soluble phenols with two peaks, 0.62 and 0.65 mg per g of f wt, respectively 3 and 12 days after treatment. A higher SA concentration (1 mM) decreased phenol content, to 0.24 and 0.2 mg per g of f wt at 3 and 12 days after treatment respectively. With cv. BSTN (Fig. 2), no significant differences were detected between SA-treated plants and the controls. However, higher SA concentrations (200 µM and 1 mM) slightly inhibited the levels of soluble phenolics.

Effect of SA treatment on the soluble phenols content in date palm roots inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*

There was a relationship between the level of soluble phenolic compounds in the roots of both cultivars and the survival rate of SA-treated and untreated plants. The level of soluble phenolics in roots was much higher in SA-treated plants than in symptomless plants infected with Foa (Fig. 3). Indeed, the content of soluble phenolics in infected roots of SA-treated cultivar JHL showing no symptoms was 3.5 mg.g⁻¹ f. wt. This was about 2 times higher than that found in untreated infected plants without disease symptoms and 6 times higher than that in untreated and inoculated plants with disease symptoms. For date palm cv. BSTN, the

Cultivar	Survival (%)	
	Control	SA-treated
Jihel	49	76
Bousthami noir	80	91

Table 1: Effect of salicylic acid (50 μM) treatment on the survival of seedlings of two cultivars of date palm, one month after inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp.*albedinis*. Values are the mean of two repetitions, 50 plants per repetition. The results obtained were significantly different. $\text{SE} \leq 5\%$.

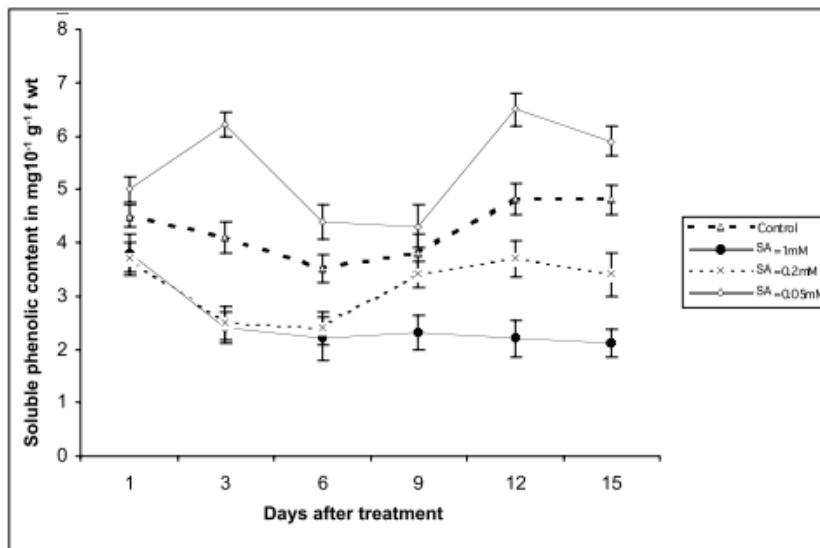


Fig. 1. Time-course of changes in the content of free phenolics in roots of date palm cv. Jihel in response to different SA concentrations. Each bar is the mean of two replicates root extracts.

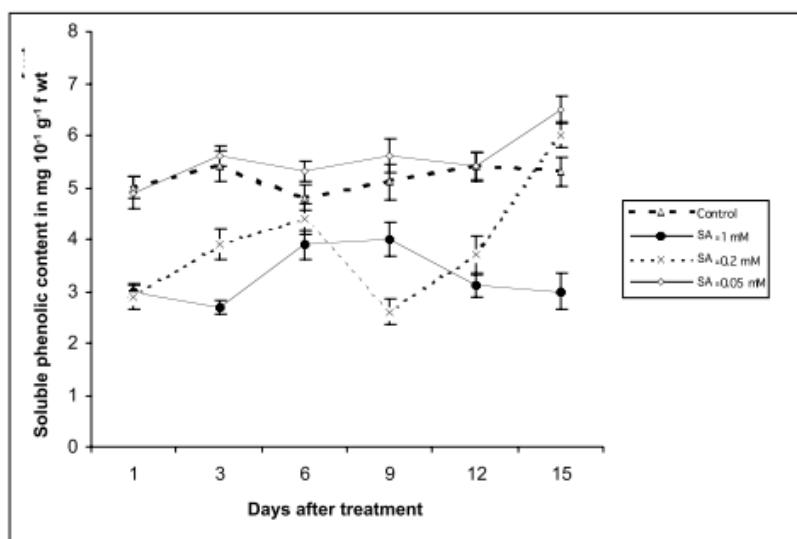


Fig. 2. Time-course of changes in the content of free phenolics in roots of date palm cv. Bousthami noir in response to different SA concentrations. Each bar is the mean of two replicates root extracts. content of root soluble phenolics in infected SA-treated plants was $2.5 \text{ mg.g}^{-1} \text{ f. wt}$.

For infected plants showing no symptoms (Fig. 3), this was about 2 times higher than that found in untreated infected plants without symptoms and 4 times higher than that found in untreated inoculated plants with symptoms. Establishment of resistance was associated with the formation of HR-like lesions around the point of inoculation of Foa. In contrast, inoculated untreated plants showed spreading necrosis. Inoculation of date palm roots stimulated the phenol metabolism of symptomless infected plants of both cultivars; this metabolism was greater when SA treatment was given, and was more evident for susceptible JHL than for resistant BSTN cultivar.

SA treatment (0.05 mM) and cell wall phenolics in date palm roots inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*.

The content of cell wall phenolic compounds was greater in the resistant than in the susceptible cultivar. This content showed little increase in either cultivar after inoculation with Foa. Furthermore, the level of cell wall phenolics induced by SA did not significantly differ from that in the untreated controls (Fig. 4).

Characterisation of soluble phenolic compounds in SA-treated date palm roots after inoculation with *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*

Analysis by TLC and HPLC showed a relationship between resistance to Foa and the level of new soluble phenolic compounds. The control roots had higher levels of caffeoylshikimic acids (Fig.5, left). When infected, the phenolic profiles of the roots changed completely. Several new non-constitutive compounds now accumulated. They were hydroxycinnamic derivatives, revealed at 320 nm, and mainly represented in this experiment by a p-coumaric derivative (pic 1) and a sinapic derivative (pic I 2) (Fig. 5, right). The phenolics that accumulated in infected plants and those in infected SA-treated plants were the same, and they were associated with the establishment of resistance.

Discussion

SA treatment increased the resistance of seedlings to Fusarium wilt. This is in agreement with other reports showing that the treatment of plants with SA can provide a significant degree of protection against pathogens (Métraux et al., 1990; Kauss et al., 1992; Raskin, 1992; Gaffney et al., 1993; Van Kan et al., 1995). This study showed that the lower susceptibility of date palm to Foa that was induced by SA was associated with the formation of HR-like lesions around the point of infection. Normally, hypersensitive lesions occur during an incompatible interaction. However, it has been reported that plants in a state of SAR resist to virulent fungal pathogens with single-cell HR (Kogel et al., 1994). Inoculation of SA-treated date

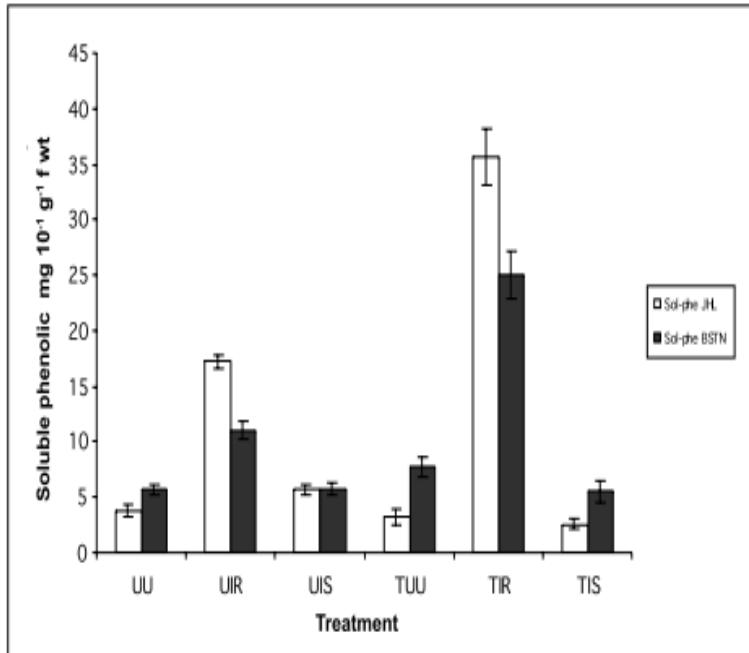


Fig. 3: Effect of SA treatment (50 μ M) on soluble phenolic contents in roots of date palm cv. Jihel (JHL) and cv. Bousthami noir (BSTN) one month after inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. UU (uninoculated plants); UIR (untreated and inoculated plants without disease symptoms); UIS (untreated and inoculated plants with disease symptoms); TUU (treated and uninoculated plants); TIR (treated and inoculated plants without disease symptoms); TIS (treated and inoculated plants with symptoms). Each bar is the mean of two replicate root extracts. Sol-phe, soluble phenolics.

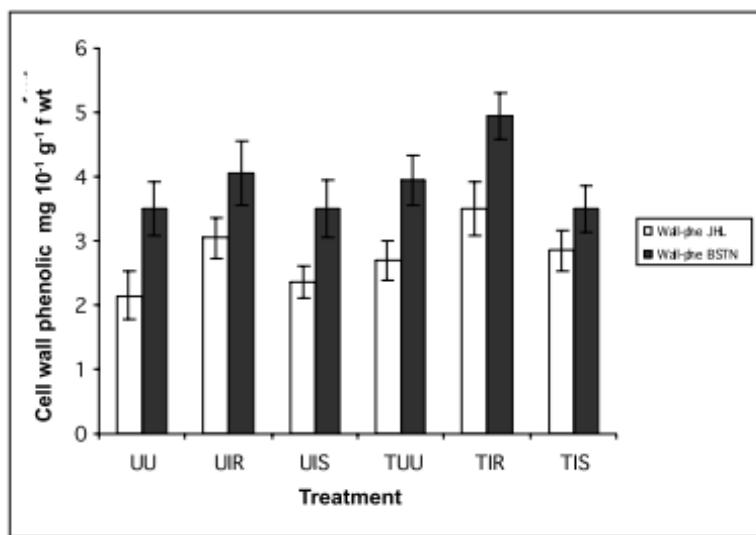


Fig. 4: Effect of SA treatment (50 μ M) on cell wall phenolics in roots of date palm cv. Bousthami noir (BSTN) and cv. Jihel (JHL) one month after inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. UU (untreated and uninoculated plants); UIR (untreated and inoculated plants without disease symptoms); UIS (untreated and inoculated plants with disease symptoms); TU (treated and uninoculated plants); TIS (treated and inoculated plants with symptom disease); TIR (treated and inoculated plants without disease symptoms). Each bar is the mean of two replicate root extracts. Wall-phe, cell wall phenolics.

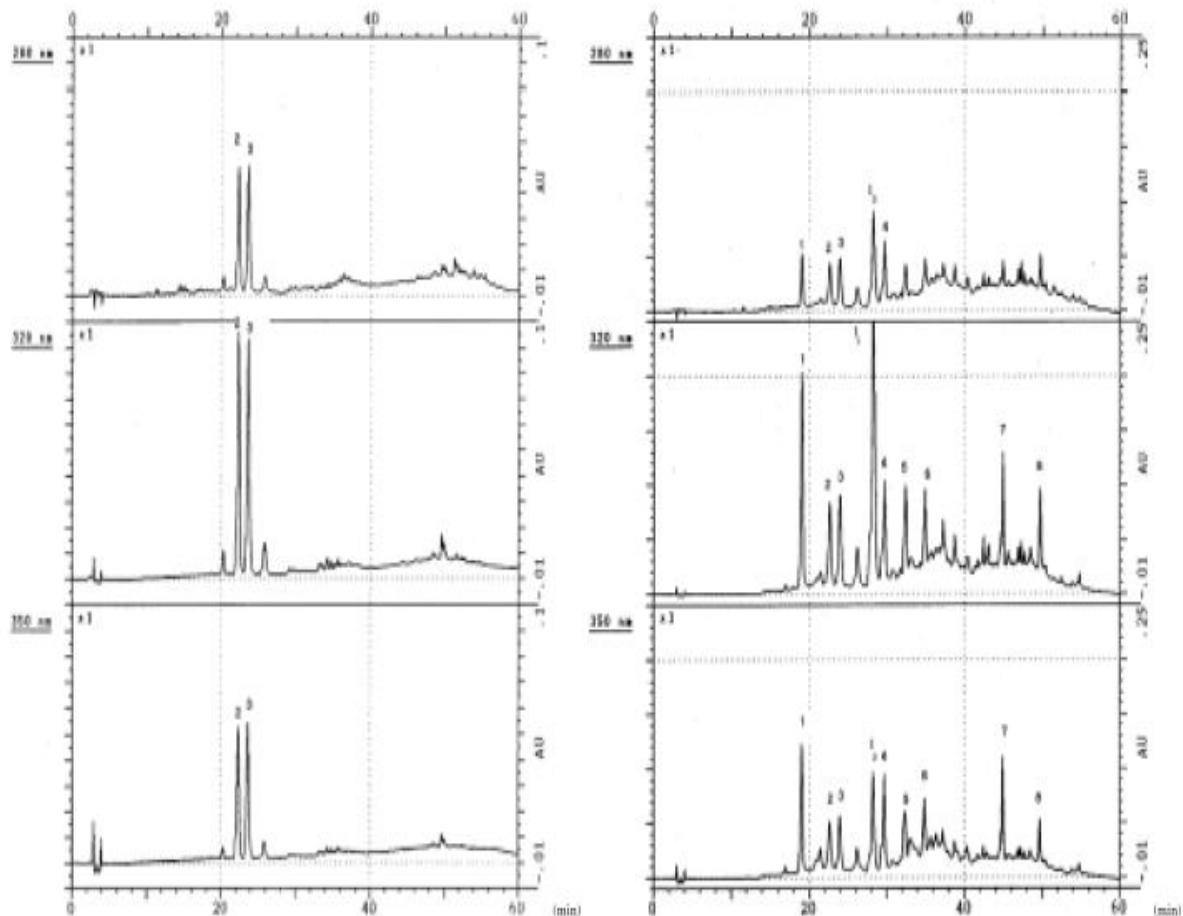


Fig. 5: Typical HPLC profiles obtained with three wave length (280 nm, 320 nm and 350 nm) of phenolics in root extracts of date palm before (left) and after (right) inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. 1: p-coumaric derivative; 2, 3: caffeoylshikimic acids, I 2 : sinapoyl-amide; 4, 5, 6, 7 and 8: other hydroxycinnamic derivatives.

palm roots with aggressive Foa strain ZAG caused a higher number of plants with such HR-like necrotic lesions. The HR is associated with cell death and restricts fungal colonisation by synthesis of chemical barriers against pathogen spread (Hammond-Kosack et al., 1996; Hammerschmidt, 1999). As well as delaying the development of disease, SA also affected the accumulation of phenolic compounds which are themselves likewise associated with plant resistance (Nicholson and Hammerschmidt, 1992; Métraux and Raskin, 1993; El Hadrami et al., 1997; Mansfield, 1999). At higher SA concentration (1 mM), the level of soluble phenolics in date palm roots decreased; this reduction was already reported by Dixon and Paiva (1995). SA may inhibit the activity of PAL, a key enzyme in the synthesis of phenolic compounds (Nicholson and Hammerschmidt, 1992). At low concentrations, SA stimulated the accumulation of soluble phenolic compounds in date palm roots. It has been suggested that SA inhibits catalase activity, leading to increased levels of H_2O_2 (Chen et al., 1993), which in turn induces PAL gene expression (Desikan et al., 1998) and synthesis of phenolic compounds (Dorey et al., 1997). The study also showed that SA treatment greatly increased the content of soluble phenolics in inoculated date palm root compared with uninoculated plants. This is in agreement with Kauss et al. (1992), who reported that SA did not directly induce the expression of resistance genes, but rather increased the sensitivity of cells to subsequent elicitor treatment. In cucumber cotyledons, it was also found that SA increased the ability of a tissue to trigger a burst of H_2O_2 in response to subsequent elicitor treatment (Kauss and Jeblick, 1995; Fauth et al., 1996). In addition, it was shown that levels of soluble phenolics were higher in the symptomless parts of the susceptible SA-treated cv. JHL than in the resistant BSTN. These higher levels are likely to be associated with the establishment of resistance since phenolic compounds have been found to have anti-fungal properties in several host-parasite interactions (Harborne, 1991). Moreover, treatment with SA slightly increased the content of cell wall phenolics. The accumulation of cell wall phenolics clearly distinguished the cultivars tested being faster and more intense in the resistant cultivar than in the susceptible one. Such an accumulation is often associated with plant resistance (Niemann et al., 1991; et al., 1996). The insolubilisation of phenolic compounds in the cell walls constitutes a mechanical defence barrier protecting the wall against cell wall-degrading enzymes (Matern and Grimmig, 1993). In addition, we found that in both the susceptible and the resistant cultivar tested, infected SA-treated roots showed the same soluble phenolics as those that occur in untreated symptomless plants. These phenolics were different from those expressed by uninoculated plants. In summary, the results

indicate that SA protects date palm from Fusarium wilt and suggest that SA induces date palm resistance by enhancing induced chemical defences.

Acknowledgements

Financial support for this work by the French-Moroccan cooperation (PRAD 00-05; 02-02 / AI: MA/01/23) and CNRST- Morocco: PROTARS II/ P51-14 is gratefully acknowledged.

Literature cited

- Chen Z., S. Silva and D. Klessig**, 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262, 1883–1886.
- Desikan R., A. Reynolds, J.T. Hancock and S.J. Neill**, 1998. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defense gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochemistry Journal* 330, 115–120.
- Dixon R. and N. Paiva**, 1995. Stress induced phenyl-propanoid metabolism. *The Plant Cell* 7, 1085–1097.
- Dorey S., F. Baillieul, M.A. Pierrel, P. Saindrenan, B. Fritig, and S. Kauffmann**, 1997. Spatial and temporal induction of cell death, defence genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 1102–1109.
- El Hadrami I., T. Ramos, M. El Bellaj, A. El Idrissi Tourane and J.J. Macheix**, 1997. A sinapic derivative as induced defence compound of date palm against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, the agent causing bayoud disease. *Journal of Phytopathology* 145, 329–333.
- El Idrissi-Tourane A., A. Oihabi and I. El Hadrami**, 1995. Effet des polyamines et des inhibiteurs de leur biosynthèse sur la croissance mycéienne de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* responsable du bayoud chez le palmier dattier. *Revue du Réseau d'Amélioration de la Production Agricole en Milieu Aride* 7, 241–247.
- Ellard-Ivery M. and C.J. Douglas**, 1996. Role of jasmonates in the elicitor and wound-inducible expression of defense genes in parsley and transgenic tobacco. *Plant Physiology* 112, 183–192.
- Enyedi A.J., N. Yalpani, P. Silverman and I. Raskin**, 1992. Localisation, conjugation and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89, 2480–2484.

- Fauth M., A. Merten, M.G. Hahn, W. Jeblick and H. Kauss**, 1996. Competence for elicitation of H₂O₂ in hypocotyls of cucumber is induced by breaching the cuticle and is enhanced by salicylic acid. *Plant Physiology* 110, 347–354.
- Gaffney T., L. Friedrich, B. Vernooij, D. Nergotto, G. Nye, S. Uknas, E. Ward, H. Kessmann, and J. Ryals**, 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261, 754–756.
- Goodman R. and A. Novacky**, 1994. The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens: A Resistance Phenomenon. APS Press, St Paul, MN, USA, 244 pp.
- Hammerschmidt R.**, 1999. Induced resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55, 77–84.
- Hammond-Kosack K.E. and J.D.G. Jones**, 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8, 1773–1791.
- Harborne J.B.**, 1991. Role of secondary metabolites in chemical defence mechanisms in plants. In: *Bioactive Compounds from Plants*. (D.J. Chadwick,, J. Marsh, ed.), John Wiley and Sons, Chichester, UK, 126–139
- Ikegawa T., S. Mayama, H. Nakayashiki and H. Kato**, 1996. Accumulation of diferulic acid during the hypersensitive response of oat leaves to *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* and its role in the resistance of oat tissues to cell wall degrading enzymes. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 48, 245–256.
- Kauss H., E. Theisinger-Hinkel, R. Mindermann and U. Conrath**, 1992. Dichloroisonicotinic and salicylic acid, inducers of systemic acquired resistance, enhance fungal elicitor responses in parsley cells. *Plant Journal* 2, 655–660.
- Kauss H. and W. Jeblick**, 1995. Pretreatment of parsley suspension cultures with salicylic acid enhances spontaneous and elicited production of H₂O₂. *Plant Physiology* 108, 1171–1178.
- Kessmann H., T. Staub, C. Hofmann, T. Maetzke and J. Herzog**, 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology* 32, 439–459.
- Kogel K.H., U. Beckhove, J. Dreschers, S. Munch and Y. Romme**, 1994. Acquired resistance in barley. *Plant Physiology* 106, 1269–1277.
- Lawton K., L. Friedrich, M. Hunt, K. Weymann, T. Staub, H. Kessmann and J. Ryals**, 1996. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant Journal* 10, 71–82.

- Malamy J. and D. Klessig**, 1992. Salicylic acid and plant defense resistance. *Plant Journal* 2, 643–654.
- Mansfield J.W.**, 2000. Antimicrobial compounds and resistance: the role of phytoalexins and phytoanticipins. In: *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. (A.J. Slusarenko, R.S.S. Fraser, L.C. Van Loon ed.), Kluwer, Amsterdam, Netherlands.
- Matern U. and B. Grimmig**, 1993. Polyphenols in plant pathology. In: *Polyphenolic Phenomena* (A. Scalbert, ed.), INRA Editions, Paris, France, 143–147.
- Métraux J.P. and I. Raskin**, 1993. Role of phenolics in plant disease resistance. In: *Biotechnology in Plant Disease Control*. Wiley-Liss Inc., New York, NY, USA 191–209.
- Métraux J.P., H. Signer, J. Ryals, E. Ward, M. Wyss-Benz, J. Gaudin, K. Raschdorf, E. Schmid, W. Blum and B. Inverardi**, 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250, 1004–1006.
- Nicholson R.L. and R. Hammerschmidt**, 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30, 369–371.
- Niemann G.J., A. Van Der Kerv, W.M.A. Niessen and K. Versluis**, 1991. Free and cell wall-bound phenolics and other constituents from healthy and fungus-infected carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) stems. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 38, 417–432.
- Raskin I.**, 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43, 439–463.
- Van Kan J.A.L., T. Cozijnsen, N. Danhash and P.J.G.M. De Wit**, 1995. Induction of tomato stress protein mRNAs by ethephon, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylate. *Plant Molecular Biology* 27, 1205–1213.
- Vernooij B., L. Friedrich, A. Morse, R. Reist, R. Kolditz-Jahwar, E. Ward, S. Uknes, H. Kessmann and J. Ryals**, 1994. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell* 6, 959–965.
- Ward E.R., S. Uknes, S.C. Williams, S.S. Dincher, D.L. Wiederhold, D.C. Alexander, P. Ahl-Goy, J.P. Métraux and J.A. Ryals**, 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3, 1085–1094.
- Ziouti A., C. El Modafar, A. Fleuriet, S. El Boustani and J.J. Macheix**, 1992. Les polyphénols, marqueurs potentiels de la résistance du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) au *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Compte rendu du Groupe Polyphénols* 16, 346–349.

Chapitre 2 : Interaction palmier dattier-*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* : modulation du “burst oxydatif” et rôle de l’acide salicylique dans la potentialisation des réactions de défense

***Phoenix dactylifera* L.-*Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* interaction: potentiation of induced disease resistance by salicylic acid**

Nos résultats antérieurs ont permis de montrer que l’application de l’acide salicylique (SA) à des plantules de palmier dattier améliore leur résistance vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa), l’agent responsable de la maladie de Bayoud, en stimulant la synthèse des composés phénoliques. Dans le présent travail, on s’est proposé d’approfondir l’étude sur les mécanismes par lesquels le SA intervient dans la défense du palmier dattier contre son pathogène. Nous nous sommes intéressés à la teneur de H_2O_2 , molécule la plus stable des formes actives de l’oxygène et aux activités catalase et peroxydase. En plus de ces composantes du « burst oxydatif », le malonyldialdéhyde (MDA), produit de la peroxydation des lipides membranaires et marqueur de la mort cellulaire et l’activité phénylalanine ammonia-lyase (PAL), enzyme clé dans le métabolisme phénolique, ont été examinés. Nous avons choisi de travailler sur des plantules issues des graines du cultivar Jihel hautement sensible à la maladie de Bayoud, ces plantules ont été traitées par la concentration de 100 μ M du SA qui n’a ni d’effet phytotoxique sur le palmier dattier ni d’effet antifongique directe sur Foa.

Les résultats obtenus ont permis de conclure que le traitement des plantules par le SA entraîne une légère augmentation de H_2O_2 , cette accumulation ne devient forte qu’après inoculation des plantules par le pathogène (elle devient 3 fois plus importante que les témoins non traités et non inoculés). De plus, nous avons noté que cette accumulation est souvent exprimée par les racines présentant une lésion nécrotique localisée au site de l’inoculation du pathogène. L’activité catalase, quant à elle, a été inhibée par le SA. Ceci est vraisemblablement la cause de l’augmentation de H_2O_2 notée après traitement des plantules par le SA. Cette inhibition de l’activité catalase par le SA est surtout vrai durant les 12 premiers jours de traitement, cependant, après ces jours et coïncidant avec les fortes teneurs en H_2O_2 , le SA semble activer la catalase. Ceci est susceptible de limiter les endommagements associés aux réactions d’oxydation que les fortes teneurs en H_2O_2 pourraient engendrer au niveau des tissus.

Concernant le MDA, il a connu une légère augmentation aussi bien pour les plantules inoculées par le pathogène que pour les plantules traitées par le SA. Cette augmentation s'est poursuivie jusqu'à la fin de l'expérience pour les plantules inoculées par Foa alors que les plantules qui sont à la fois traitées par le SA et inoculées par le pathogène ont présenté une diminution du MDA survenue à la fin du traitement. L'accumulation de MDA notée durant les premiers jours est positivement corrélée avec celle de H₂O₂, ce qui laisse supposer que H₂O₂ serait impliqué dans l'induction de la mort cellulaire associée à la formation de la nécrose localisée.

La peroxydase a aussi montré une forte activation (300%) dans les racines des plantules qui sont à la fois traitées par le SA et élicitées par le pathogène. Cette augmentation a coïncidé avec la production de H₂O₂ et semble intervenir dans le renforcement des parois cellulaire dépendant de H₂O₂. Ce renforcement pariétal est supporté par l'étude de l'activité PAL qui a été stimulée par le SA aussi bien en présence qu'en absence du pathogène. Cette stimulation serait à l'origine de l'activation de la synthèse des composés phénoliques solubles et pariétaux mise en évidence dans nos travaux antérieurs. Un tel renforcement pariétal serait à l'origine de la restriction du pathogène au niveau du site de son inoculation limitant ainsi sa progression dans les tissus végétaux de la plante hôte.

Les résultats présentés dans cette étude, indiquent que l'augmentation de la production de H₂O₂ couplée avec la stimulation de la peroxydation des lipides et de l'activité PAL, obtenues à la suite du traitement par le SA pourraient contribuer à la résistance du palmier dattier à la maladie du Bayoud. Le traitement des plantules de palmier dattier par le SA semble préparer les tissus à déclencher une réaction de défense plus forte et plus efficace contre l'invasion du pathogène.

Phoenix dactylifera L.-Fusarium oxysporum f.sp. albedinis interaction: potentiation of induced disease resistance by salicylic acid

Abdelhi Dihazi^{1, 2}, , Abdelbasset El Hadrami³, Fatima Jaiti¹, Fouad Daayf³, Hassan Dihazi⁴ and Mohammed Amine Serghini^{2*}

Authors' addresses : ¹Laboratoire de Biotechnologies, Protection et Valorisation des Ressources Végétales, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, B.P. 2390, 40 000, Marrakech-Morocco ; ²Laboratoire de Biotechnologie et de Valorisation des Ressources Naturelles, Université Ibn Zohr Faculté des Sciences, 80060 Agadir-Morocco ; ³Dept. Plant Science, University of Manitoba, Winnipeg MB, Canada; ⁴Clinical Proteomics Laboratories, University of Göttingen, 37075 Germany.

*Corresponding author: dihazi_abdel@yahoo.fr

Keywords: Bayoud, Date palm, Salicylic acid, Hydrogen peroxide, Lipid peroxidation, Catalase, Peroxidases, Phenylalanine ammonia-lyase.

Abstract

The effects of salicylic acid (SA) treatment on H₂O₂ and malonyldialdehyde (MDA) levels and on peroxidases, catalase and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activities were evaluated in date palm cultivar Jihel in relation with its infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, the agent causing the bayoud disease. Seedlings treated with SA (100µM) enhanced the content of H₂O₂, which is involved in plant defence. Pre-treated date palm seedlings showed a 3-times faster and earlier accumulation of H₂O₂ after inoculation with Foa. MDA, a product of lipid peroxidation, showed 50% increase that coincided with the H₂O₂ accumulation in SA-treated and inoculated plants. The phenylalanine ammonia-lyase activity, a key phenolic biosynthesis enzyme, was 2-times greater in SA-treated seedlings inoculated or uninoculated with Foa. The activity of peroxidase, involved in polymerization of phenolics and formation of lignin, was also increased significantly (300%) when plants were both treated with SA and inoculated by Foa. As for catalase activity, it decreased progressively after treatment with SA, leading to more H₂O₂ and resistance. The results presented here indicate that increased production of H₂O₂ coupled with increased lipid peroxidation and PAL activity, obtained after SA treatment, may contribute to the resistance of date palm to Bayoud disease.

Introduction

Plants use a wide arsenal of defence reactions against pathogens. One of the earliest responses activated after host plant recognition is the oxidative burst, in which levels of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H₂O₂), superoxide (O₂⁻), hydroxyl radicals (OH⁻),

rapidly increased (Rossard et al. 2006). Pathogen recognition by a host can activate the hypersensitive response (HR) with localized necrotic lesions which indicated a resistance reaction (Grant and Lamb 2006).

The phytohormone salicylic acid (SA) is known to contribute to plant defence signalling (Anand et al. 2008), and it is considered as the main molecule responsible for systemic acquired resistance (SAR) (Grant and Lamb 2006). Pellinen et al. (2002) indicated that potentiating defence gene activation and plant cell death by H₂O₂ needs SA. Accumulation of SA has been shown to be crucial for the expression of PR-1 proteins (Yalpani et al. 1991) which have antimicrobial activity and are thought to be involved in plant resistance (Van Loon et al. 2006).

Although the mechanism of SA-mediated plant defence is not completely understood, its essential role in plant defence is universally accepted. Treatment with SA or its analogous, such as the 2,6-dichloroisonicotinic acid or the benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester, induces SAR, and leads to resistance establishment against pathogens (Wang et al. 2005). Furthermore, it was reported that SA-induced SAR is mediated by ROS, since SA can bind to catalase and inhibits it (Chen et al. 1993), thereby preventing the decomposition of H₂O₂ produced in plants. H₂O₂ has been implicated in several processes such as the cross-linking of cell wall proteins (Almagro et al. 2009), the regulation of pathogenesis (PR-1) gene expression (Chen et al. 1995), the induction of genes involved in phenylpropanoid compounds accumulation (Schenk et al. 2000), the triggering of hypersensitive cell death (Soylu et al. 2005) and the direct inhibition of the pathogens' growth (Wu et al. 1995). Using the interaction tomato-*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Mandal et al. (2009), have reported that the potentiation of PAL activity with SA was related to resistance. PAL catalyzes the conversion of L-phenylalanine into *trans*-cinnamate, the initial step of the phenylpropanoid pathway leading to the biosynthesis of phenolics with phytoalexin activity (Nielsen et al. 2004).

H₂O₂ levels are generally regulated by enzymes involved in plant defence response such catalase, peroxidases and superoxide dismutase. Catalase deficiency led to elevation of H₂O₂ contents in *Arabidopsis thaliana* (Vandenabeele et al. 2004), while peroxidases were reported to catalyse the H₂O₂-dependent cross-linking of cell wall components leading to the cell wall lignification (Almagro et al. 2009).

Our previous data indicated that date palm resistance to Bayoud disease is associated with biosynthesis and accumulation of new phenolic compounds (El Hadrami et al. 1997, El Hadrami 2002, El Hassni et al. 2004) and this synthesis is activated with SA treatment (Dihazi

et al. 2003). In order to elucidate the mechanism through which SA acts in date palm seedlings challenged by Foa, lipid peroxidation, H₂O₂ content, and the activity of peroxidase, catalase and PAL were investigated.

Material and Methods

1- Plant material, Inoculation by Foa and SA treatments

We used date palm seedlings (*Phoenix dactylifera* L) grown in pots containing a mixture of sand and peat (1:1 (v/v)), in a growth chamber with 25°C and 16 h photoperiod. Three-month-old seedlings of the cultivar Jihel (JHL) highly susceptible to *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa) wilt were removed from pots, rinsed and placed into 250-ml flasks containing a SA (100µM) solution. The inoculum was a conidial suspension of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa) ZAG strain originating from Zagora in the south of Morocco and known for its aggressiveness (El Idrissi Tourane et al. 1995). The conidial suspension was adjusted to 10⁶ spores/ml. Six days after treatment with SA, plants were removed and the main root was injected with 10µl of conidial suspension using a syringe and then returned to flasks containing SA solution. Plant material was removed from browning zones around the inoculation site. Two groups of treated plants were considered, inoculated (TI) and uninoculated (TU). Control treatments were untreated inoculated (UI) and untreated uninoculated (UU) plants. Three replicates per treatment were performed and the whole experiment was repeated twice.

2- Determination of H₂O₂ content

Hydrogen peroxide levels were determined according to Sergiev et al. (1997). Root tissue (500 mg) was homogenized in ice bath with 0.1% trichloroacetic (TCA) solution and centrifuged at 10 000 g for 20 min. 0.5 ml of the supernatant was added to 0.5 ml 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 1 ml of 1M KI. The absorbance was determined at 390 nm and the content of H₂O₂ was based on standard curve obtained under the same conditions.

3- Lipid peroxidation

The level of lipid peroxidation was estimated by measuring the accumulation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as described by Rusterucci et al. (1996). Root tissue (500 mg) was homogenized in ice bath with 0.1% trichloroacetic (TCA) solution and centrifuged at 10 000 g for 20 min. 0.5 ml of the supernatant obtained was added to 1 ml 0, 5% TBA in

20% TCA. After incubating in boiling water during 30 min, the reaction was stopped by placing tubes in an ice bath. The samples were centrifuged at 10.000 g for 5 min, and the absorbance of supernatant was determined at 532 nm. The value for non-specific absorption at 600 nm was subtracted. Content of lipid peroxides was calculated by using the molar extinction coefficient for malonyldialdehyde ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4- Enzymes analysis

For enzymes analysis, root tissue (100 mg) was homogenized in 1 ml of potassium phosphate buffer (pH 7.0) containing 4% polyvinylpyrrolidone and centrifuged at 10 000 g for 30 min and the supernatant was used as enzyme extract. All steps were conducted at 4°C and content of proteins was determined by method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard.

Peroxidase Assay

Total peroxidase activity was assessed at 470 nm using guaiacol as the hydrogen donor. The reaction mixture was composed by 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0 and 25 mM guaiacol. The reaction was started with 20 μ l of H₂O₂ at 10% and stopped after 3 min (El Hadrami and Baaziz 1995). Peroxidase activity was calculated using the molar extinction for tetraguaiacol ($26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and the specific activity was expressed as units per milligram of total proteins.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of peroxidases was carried out using acrylamide-bisacrylamide (30 – 0.8) gels as described by Baaziz (1989). Twenty μ l of enzyme extract were subjected to electrophoresis. Electrophoretic separation was carried out at constant current of 60 mA for 2–3 h. The electrophoresis buffer was TGS (Tris-Glycine-SDS) pH 8.1. Peroxidase activity was visualized in gels using guaiacol and H₂O₂ (50 mM and 0.2 M respectively) in 0.2 M acetate buffer, pH 5. The reaction was stopped by removing the substrates and rinsing the gels with water. SDS-PAGE experiments were repeated twice to confirm the reproducibility of the method.

Catalase activity assay

Catalase activity was determined by measuring the decomposition of H₂O₂ at 240 nm (Kato and Shimizu 1987). One ml of catalase assay reaction mixture contained 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7 and 0.1 ml enzyme extract. The reaction was started by the addition of 50 μ l 3% H₂O₂. The initial rate of disappearance of H₂O₂ was followed and the activity was

calculated using the molar extinction coefficient for H₂O₂ (40 mM⁻¹ cm⁻¹). Catalase activity was expressed as enzymatic units per mg of proteins.

PAL activity assay

Phenylalanine ammonia-lyase activity was determined at 290 nm by measuring the content of cinnamic acid produced after transformation of L-phenylalanine. The reaction mixture consisted of 200 µl of enzymatic extract, 1 ml of 0.5 M Tris HCl buffer, pH 8 and 200 µl of 10 mM L- phenylalanine. After incubation 60 min at 37°C, the reaction was stopped by 0.05 ml of HCl (5 N). Extraction of cinnamic acid was conducted with diethyl ether twice. Content of cinnamic acid was given on the base of a standard curve. PAL activity was expressed as units per mg of total proteins.

Statistical analyses of the data

Collected data were submitted to ANOVA analysis using SPSS Statistic 17.0, the significance of differences among treatments, for the two experiments, was recorded at p<0.05 using Post-hoc comparisons. The similarity of results between the two experiments was confirmed by univariate test at p<0.05.

Results

Without SA treatments, date palm seedlings challenged by Foa showed a general progress on of wet necrosis on their roots. After one month of incubation, more than 90% of plants showed leaf wilting and finally completely collapsed. In contrast, after SA treatment, the leaf yellowing was reduced and the roots generally developed limited necrotic lesions around the inoculation site.

Effects of SA treatment on H₂O₂ content

SA treatment had no significant impact on H₂O₂ accumulation before 6 days; later, this content slightly increased as compared to the control (treatment UU) (Fig. 1). After inoculation with Foa, we noted a significant increase in the content of H₂O₂ (at p<0.05) reaching 300 % of the control (treatment UU) after 24 days, in both SA-treated and untreated plants. However, the response was greater and earlier in SA-treated roots since the content of H₂O₂ started increasing the 1st day after inoculation and was significantly higher (about two times) than in untreated inoculated plants at the 9th day post-inoculation (dpi). This expression of the oxidative burst coincided with the formation of limited necrotic lesions

around the infection site in SA-treated plants. In contrast, inoculated untreated plants showed larger necrosis area.

Effects of SA treatment on lipid peroxidation

The level of MDA was not significantly different from SA-treated or untreated plants before inoculation with Foa (Fig. 2). Later, MDA slightly increased reaching 152% of the control, at 9 dpi, in both SA-treated plants and inoculated ones. At 24 dpi, MDA showed a 2-fold increase (222%) in untreated and inoculated plants while it decreased to 50% in SA-treated and inoculated plants as compared to the control (treatment UU).

Effects of SA treatment on peroxidase activity

Exogenous application of SA increased the peroxidase activity to about 150 % of the control plants. The effect of SA on peroxidase activity was significantly greater (at $p<0.05$) after the inoculation with the pathogen. The peroxidase activity showed two peaks: 300% and 193% of the control (treatment UU), at 3 and 9 days post-inoculation, respectively (Fig. 3). After the second peak, peroxidase activity gradually decreased but remained higher than the control. In untreated inoculated roots, the peroxidase activity was enhanced less since the maximum activity was just about 133% of the control at 3 days after inoculation.

SDS-PAGE analysis showed that multiple isoenzymes of peroxidases were present in inoculated plants treated or not with SA as compared to uninoculated plants. One additional band was more pronounced in SA-treated, inoculated plants and had a relative electrophoretic mobility (Rm) of 0.89 (Fig. 4). This band was detected at one day after inoculation in SA-treated date palm roots and attested that the response was faster and earlier after SA treatment.

Effects of SA treatment on catalase activity

Catalase activity decreased considerably (significant difference at $p < 0.05$ was noted) following the treatment by SA (Fig. 5). This activity was 55% and 29% of the control (treatment UU) for both inoculated and uninoculated plants at 6 and 12 days after SA-treatment, respectively. In untreated and inoculated plants, catalase activity was reduced to 37% and 30% of the control at 6 and 24 days post-inoculation, respectively. Between the 1 and 6 days post-inoculation, the activity of catalase decreased more in SA-treated than in untreated plants. At 15 days after SA-treatment, catalase activity increased by 185% and 57% of the control for inoculated plants and uninoculated ones, respectively.

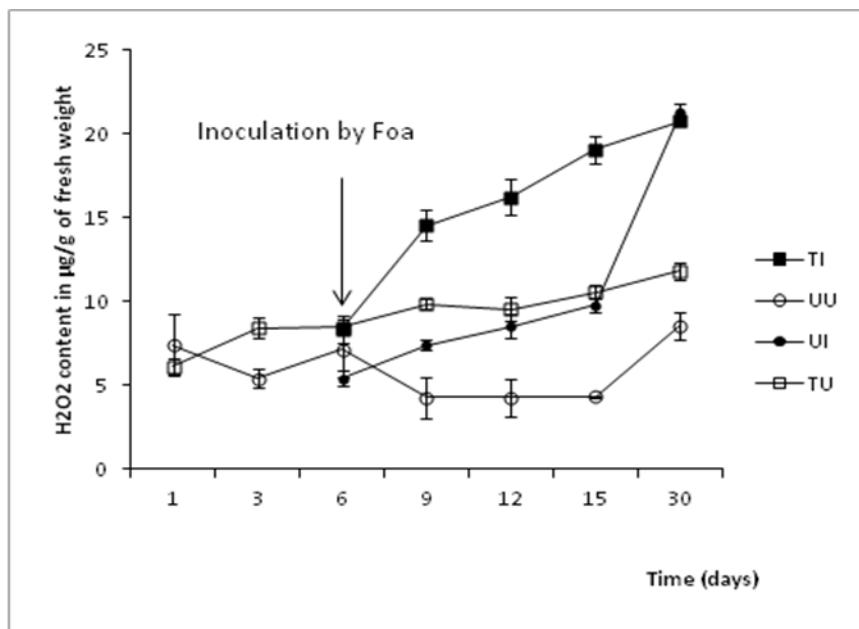


Fig. 1: Time-course of H₂O₂ contents in roots of date palm cv Jihel in response to salicylic acid treatment (100 µM) and inoculation with *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* (Foa) at the 6th day. UU (untreated and uninoculated plants); TU (treated and uninoculated plants); UI (untreated and inoculated plants); TI (treated and inoculated plants). Bars represent the standard errors to the means.

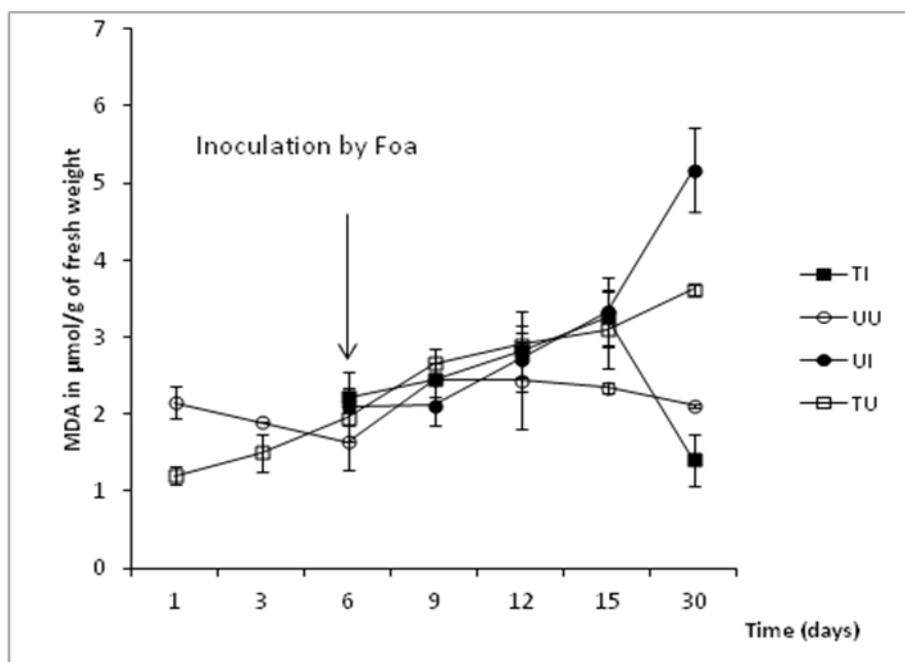


Fig. 2: Time-course of malonyldialdehyde (MDA) contents in roots of date palm cv. Jihel in response to treatment by salicylic acid (100 µM) and inoculation with *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* (Foa) at the 6th day. UU (untreated and uninoculated plants); TU (treated and uninoculated plants); UI (untreated and inoculated plants); TI (treated and inoculated plants). Bars represent the standard errors to the means.

Both the inoculation of the roots with the pathogen or their treatment by SA inhibited catalase activity and this may explain increased content of H₂O₂.

Response of PAL activity to SA treatment

PAL activity was significantly enhanced in SA-treated plants; it reached 208% of the control (treatment UU) at 3 days after SA-treatment. Later, this activity gradually decreased.

After inoculation with Foa, PAL activity increased again reaching 260 % of the control at the 3th day post-inoculation. This second peak also occurred at 9 days after SA treatment. In the untreated inoculated plants, PAL activity remained low during the three days following inoculation and then decreased to 44% of the control at 24 days post-inoculation.

Discussion

We have previously examined the activation of phenolic metabolism, following treatments with SA or jasmonic acid, and its relation to the protection of date palm against Foa (Dihazi et al. 2003, Jaiti et al. 2004). The present study showed that the lower susceptibility of date palm to Foa, obtained after treatment with SA, was associated with a modulation of some compounds and activity of certain enzymes directly or indirectly involved in plant defence. It was reported that exogenous application of SA may generate an endogenous accumulation of SA that induces plant resistance to pathogens (Mandal et al. 2009). SA treatment of date palm seedlings induced the accumulation of H₂O₂ after plants were inoculated with the pathogen. This corroborates other reports suggesting that SA increases the ability of tissues to trigger an H₂O₂ burst in response to subsequent elicitor treatments (Chaouch et al. 2010). This accumulation was stronger and earlier than in untreated inoculated plants and occurred in roots along with HR-like lesions around the inoculation site. In untreated inoculated date palm seedlings, H₂O₂ increased later in plants showing disease symptoms. This result suggested that H₂O₂ is probably involved in the induction of the hypersensitive cell death and could play an important role in date palm defence reaction against its invading pathogen. H₂O₂ has been shown to induce an array of molecular, biochemical, and physiological responses to pathogen attacks in plant cells (Thoma et al. 2003). It can diffuse into cells and activate many of the plant defences including programmed cell death (Dangl and Jones 2001) and defence gene expression (Van Breusegem 2006).

Beside H₂O₂ generation, lipid peroxidation, a marker typical of cellular membrane disruption (Mandal et al. 2011), was enhanced in both SA-treated inoculated (TI) and untreated inoculated (UI) date palm roots. This enhancement occurred in roots showing H₂O₂

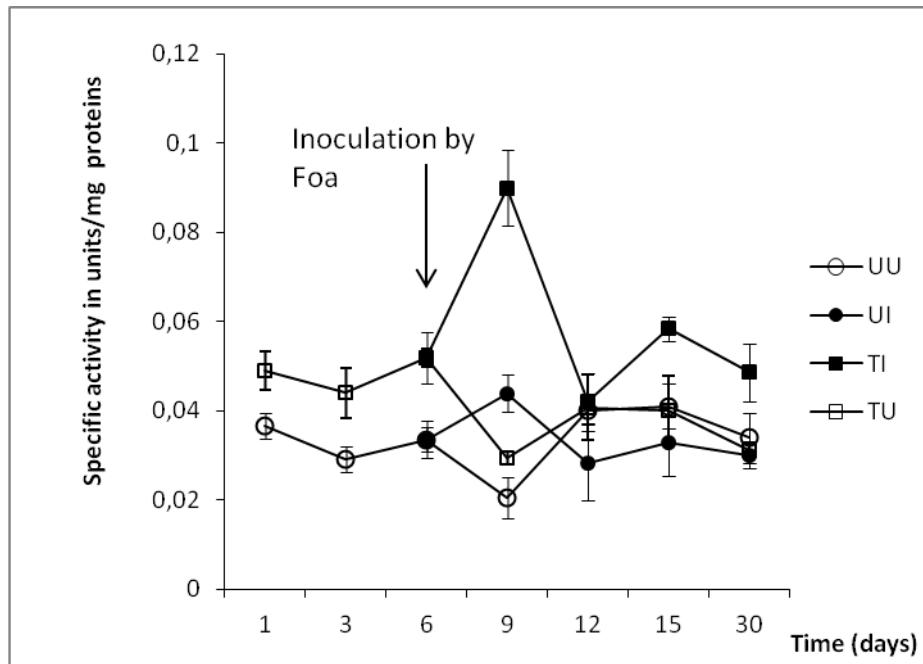


Fig. 3: Activity of peroxidases in roots of date palm cv. Jihel in response to treatment by salicylic acid (100 µM) and inoculation with *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* (Foa) at the 6th day. UU (untreated and uninoculated plants); TU (treated and uninoculated plants); UI (untreated and inoculated plants); TI (treated and inoculated plants). Bars represent the standard errors to the means.

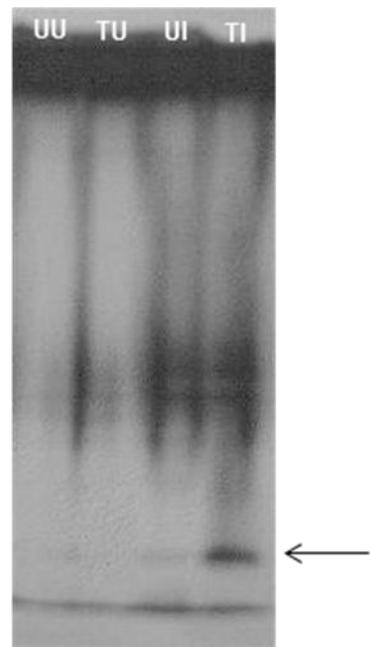


Fig. 4: SDS-PAGE of guaiacol peroxidase in roots of date palm cv. Jihel in reponse to treatment by salicylic acid (100 µM) and inoculation with *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* (Foa) at the 6th day. UU (untreated and uninoculated plants); TU (treated and uninoculated plants); UI (untreated and inoculated plants); TI (treated and inoculated plants). Arrow points to additional band found in TI roots.

accumulation. This may indicate a positive correlation between the oxidative burst and the degree of lipid peroxidation. These results are in accordance with other reports suggesting that H₂O₂ can be expected to be responsible for lipid peroxidation (Shimzu et al. 2006), and may react with SA to form a SA-free radical which in turn could produce lipid peroxidation products (Anderson et al. 1998). At 15 days post-treatment with SA, the decrease in the lipid peroxidation coincided with a decrease in H₂O₂ accumulation. This could be related to the activity of antioxidant enzymes such catalase and peroxidase that reduced the level of H₂O₂ either by direct decomposition or oxidation in order to protect tissues against oxidative stress damage (Mandal et al. 2011).

The likely involvement of catalase activity on SA-dependent defence reaction in date palm roots was assessed. It appeared that, in date palm plants, SA inhibits catalase activity which could be responsible for the accumulation of H₂O₂. Decreased catalase activity was described in several incompatible host-pathogen interactions (Madhusudhan et al. 2009) and was suggested to increase H₂O₂ levels and to trigger programmed cell death (Gechev et al. 2004). It is also reported that the onset of the programmed cell death, during plant pathogen reactions, required suppression of ROS detoxifying enzymes (Mittler et al. 1999). Thus, H₂O₂ likely play an important role in the collapse and necrosis of tissues leading to the immobilization of the pathogen at the site of the infection (Gobel et al. 2003).

However, at higher H₂O₂ levels, SA seems to increase catalase activity. The induction of catalase activity could be responsible for the reduction of H₂O₂ and lipid peroxidation (Velikova et al. 2000) occurring later after SA treatment. This was to counter higher levels of H₂O₂ in roots and prevent tissues from oxidative damage (Mittler et al. 2004).

SA may also be involved in peroxidase mediated reactions resulting in cell wall strengthening, since it was revealed that SA stimulated peroxidase activity in both inoculated and uninoculated date palm plants. This result strengthens previous suggestions that SA accumulation is required for peroxidase activation (Patel et al. 2004). Moreover, increased activity of peroxidase was parallel to the production of more H₂O₂. The association of H₂O₂ formation and increased activity of the antioxidative system with the induction of defence responses has been reported in many plant-pathogen interactions (Mittler 2002). Peroxidases are well known class of PR proteins, and they are induced in host plant tissues after pathogen infection (van Loon et al. 2006, Dihazi et al. 2012). SA may act by triggering H₂O₂ burst which is essential for the peroxidases-mediated H₂O₂-dependent cross-linking of cell wall components with the objective of blocking pathogen colonization (Almagro et al., 2009). In

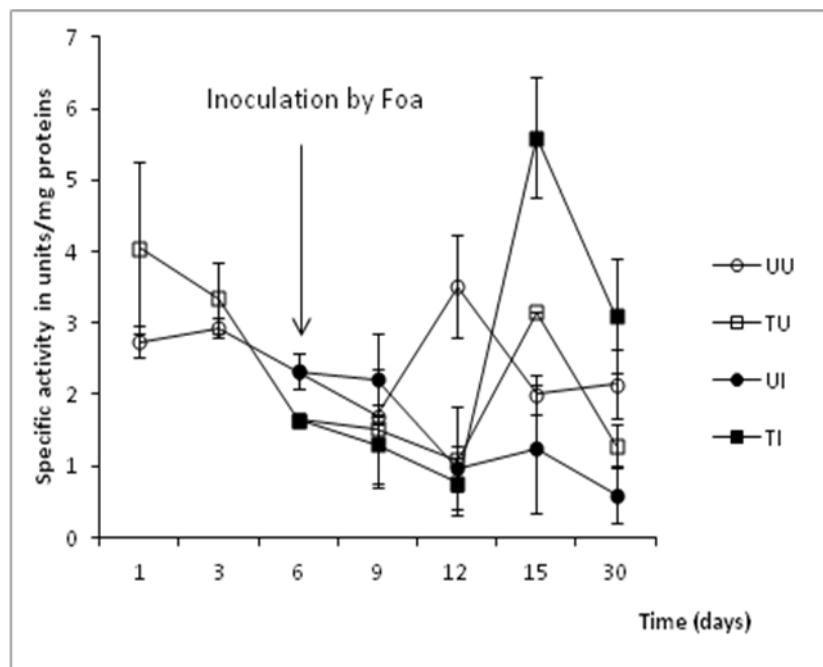


Fig. 5: Activity of catalase in roots of date palm cv. Jihel in response to treatment by salicylic acid (100 μ M) and inoculation with *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* (Foa) at the 6th day. UU (untreated and uninoculated plants); TU (treated and uninoculated plants); UI (untreated and inoculated plants); TI (treated and inoculated plants). Bars represent the standard errors to the means.

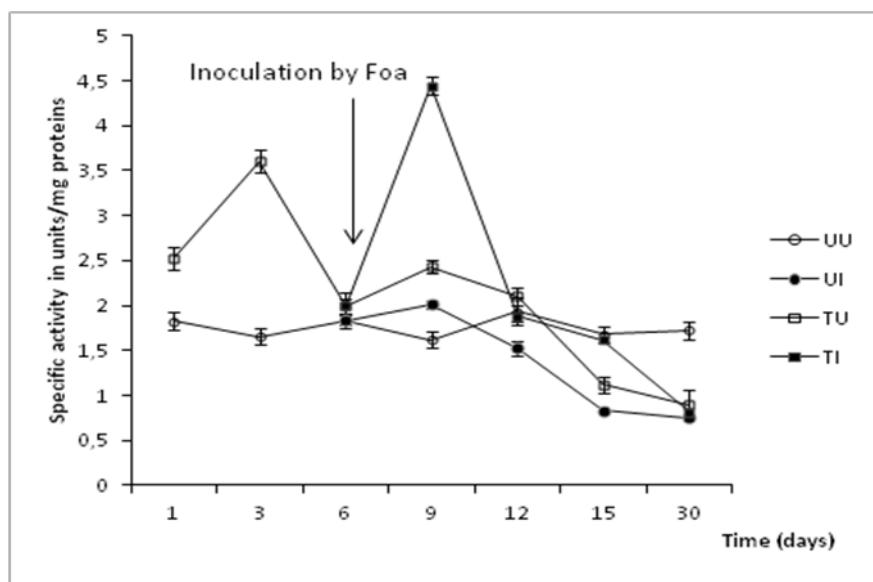


Fig. 6: Activity of phenylalanine ammonia-lyase in roots of date palm cv. Jihel in response to treatment by salicylic acid (100 μ M) and inoculation with *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* (Foa) at the 6th day. UU (untreated and uninoculated plants); TU (treated and uninoculated plants); UI (untreated and inoculated plants); TI (treated and inoculated plants). Bars represent the standard errors to the means.

untreated inoculated samples no significant increase in peroxidase activity was detected and cell wall was abolished and plants died.

Phenylalanine ammonia-lyase catalyzes the first step in phenolic metabolism leading to the conversion of L-phenylalanine into *trans*-cinnamate, a key biochemical reaction of phenylpropanoid pathway in plants. In date palm seedling, PAL activity was enhanced by SA treatment in elicited plants. This increase could be responsible for phenolic compounds accumulation occurred in date palm roots after SA treatment (Dihazi et al. 2003).

The stimulation of PAL activity has been reported in several host-parasite interactions and often correlated with plant resistance (Nicholson and Hammerschmidt 1992). Our data suggested that PAL activation required SA since inoculated untreated plants did not show PAL stimulation. This is in agreement with result reported by Patel et al. (2004) who indicated that there was a positive correlation between SA level and PAL activity in *in vitro* cultured banana treated by *Fusarium* derived elicitors. This activation did not require H₂O₂ accumulation since untreated inoculated plants did not show PAL induction in spite of the higher level of H₂O₂ noted at the end of the experiment. Similar results were reported in soybean cell suspensions in which Delledonne et al. (1998) demonstrated that H₂O₂ was not a signal for PAL activation.

The results presented in this study indicate that SA pre-treatment strengthens the oxidative burst in date palm plants leading to the enhancement of induced chemical defences. Thus, SA can provide a significant degree of protection against invading pathogens by preparing the tissues to trigger efficient defence reactions.

Acknowledgements

Financial support for this work was provided by PRAD 06-02, Protars II N° P15/14, AI (France-Maroc) 01/23 and AI (Tunisie-Maroc) 24/02. DMK (Deutsch-Marokkanisches Kompetenznetzwerk) is gratefully acknowledged.

References

- Almagro L, Gómez Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barcelo A, Pedrenô MA.** (2009) Class III peroxidases in plant defence reactions. *J Exp Bot* 60: 377-390
- Anand A, Uppalapati SR, Ryu CM, Allen SN, Kang L, Tang Y, Mysore KS.** (2008) Salicylic acid and systemic acquired resistance play a role in attenuating crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* 146: 703-715
- Anderson MD, Zhixiang C, Klessig DF.** (1998) Possible involvement of lipid peroxidation in salicylic acid-mediated induction of PR-1 gene expression. *Phytochem* 47: 555-566
- Baaziz M.** (1989) The activity and preliminary characterization of peroxidase in leaves of cultivars of date palm, *Phoenix dactylifera* L. *New Phytol* 111: 403-411
- Bradford MM.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *An Biochem* 72: 248-254
- Chaouch S, Queval G, Vanderauwera S, Mhamdi A, Vandorpe M, Langlois-Meurinne M, Van Breusegem F, Saindrenan P, Noctor G.** (2010) Peroxisomal hydrogen peroxide is coupled to biotic defense responses by isochorismate synthase 1 in a daylength-related manner. *Plant Physiol* 153: 1692-1705
- Chen Z, Malamy J, Henning J, Conrath U, Sanchez-Casas P, Silva H, Ricigliano J, Klessig DF.** (1995) Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4134-4137
- Chen Z, Silva H, Klessig DF.** (1993) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262: 1883-1886
- Dangl JL, Jones JDG.** (2001) Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* 411: 826-33
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C.** (1998) Nitritic oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588
- Dihazi A, Jaiti F, Zouine J, El Hassni M, El Hadrami I.** (2003) Effect of salicylic acid on phenolic compounds related to date palm resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Phytopathol Mediterr* 42: 9-16
- Dihazi A, Jaiti F, Taktak W, kilani-Feki O, Jaoua S, Driouich A, Baaziz M, Daayf F, Serghini MA.** (2012) Use of two bacteria for biological control of Bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* in date palm (*Phoenix dactylifera* L) seedlings. *Plant Physiol Biochem* 55: 7-15
- El Hadrami I, Baaziz M.** (1995) Somatic embryogenesis and analysis of peroxidase in *Phoenix dactylifera* L. *Bio Plant* 37: 197-203

- El Hadrami I, Ramos T, El Bellaj M, El Idrissi-Tourane A, Macheix JJ.** (1997) A sinapic derivative as induced defense compound of date palm against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, the agent causing bayoud disease. J Phytopathol 145: 329-333
- El Hadrami I.** (2002) Infections racinaires localisées et rôle des dérivés hydroxycinnamiques dans la résistance du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) au *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal du bayoud. Polyphenols Actualités 22: 19-26
- El Hassni M, Jaiti F, Dihazi A, Ait Barka S, Daayf F, El Hadrami I.** (2004) Enhancement of defense responses against Bayoud disease by treatment of date palm seedling with an hypoaggressive *Fusarium oxysporum* isolate. J Phytopathol 152: 1-8
- El Idrissi-Tourane A, Oihabi A, El Hadrami I.** (1995) Effet des polyamines et des inhibiteurs de leur biosynthèse sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal du Bayoud. Revue du Réseau d'Amélioration de Production Agricole en Milieu Aride 7: 241-247
- Gechev T, Gadjev I, Hille J.** (2004) An extensive microarray analysis of AAL-toxin 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
- Göbel C, Feussner I, Rosahl S.** (2003) Lipid peroxidation during the hypersensitive response in potato in the absence of b-lipoxygenases, J Biol Chem 278: 52834-52840
- Grant M, Lamb C.** (2006) Systemic immunity. Curr Opin Plant Biol 9: 414-420
- Jaiti F, Dihazi A, El Hadrami A, El Hassni M, El Hadrami I. (2004) Effect of exogenous application of jasmonic acid on date palm defense reaction against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Phytopathol Meditarr 43: 325-331
- Kato M, Shimizu S.** (1987) Chlorophyll metabolism in higher plants VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves; phenolic-dependent peroxidative degradation. Can J Bot 65: 729-735
- Madhusudhan KN, Srikanta BM, Shylaja MD, Prakash HS, Shetty HS.** (2009) Changes in antioxidant enzymes, hydrogen peroxide, salicylic acid and oxidative stress in compatible and incompatible host-tobamovirus interaction. J Plant Inter 4: 157-166
- Mandal S, Mallick N, Mitra A.** (2009) Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato, Plant Physiol Biochem 47: 642-649
- Mandal S, Das RK, Mishra S.** (2011) Differential occurrence of oxidative burst and antioxidative mechanism in compatible and incompatible interactions of *Solanum lycopersicum* and *Ralstonia solanacearum*. Plant Physiol Biochem 49: 117-123

- Mittler R, Herr EH, Orvar BL, Van Camp W, Willekens H, et al.** (1999) Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14165-14170
- Mittler R.** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405-410
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F.** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9: 490-498.
- Nicholson RL, Hammerschmidt R.** (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann Rev Phytopathol* 30: 369-371
- Nielsen KA, Gottfredsen CH, Buch-Pedersen MJ, Ammitzboll H, Mattsson O, Duus JO, Nicholson RL.** (2004) Anti-microbial flavonoid 3 deoxyanthocyanidins in Sorghum bicolor self-organize into spherical structures. *Physiol Mol Plant Pathol* 65: 187-196
- Patel M, Kothari IL, Mohan JS.** (2004) Plant defense induced in *in vitro* propagated banana (*Musa paradisiaca*) plantlets by Fusarium derived elicitors. *Indian J Exp Biol* 42: 728-731
- Pellinen RI, Korhonen MS, Tauriainen AA, Palva ET, Kangasjärvi J.** (2002) Hydrogen Peroxide Activates Cell Death and Defense Gene Expression in Birch. *Plant Physiol* 130: 549-560.
- Rossard S, Luini E, Péralt JM, Bonmort J, Roblin G.** (2006) Early changes in membrane permeability, production of oxidative burst and modification of PAL activity induced by ergosterol in cotyledons of *Mimosa pudica*. *J Exp Bot* 57: 1245-1252
- Rustérucci C, Stallaert V, Milat ML, Pugin A, Ricci P, Blein JP.** (1996) Relationship between active oxygen species, lipide peroxidation, necrosis and phytoalexin production induced by elicitors in Nicotiana. *Plant Physiol* 111: 885-891
- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM.** (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11655-11660
- Sergeiv I, Alexieva V, Karanov E.** (1997) Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Compt. Rend. Acad Bulg Sci* 51
- Shimzu N, Hosogi N, Hyon GS, Jiang S, Inoue K, Park P.** (2006) Reactive oxygen species (ROS) generation and ROS induced lipid peroxidation are associated with plant membrane modifications in host cells in response to AK-toxin from *Alternaria alternate* Japanese pear pathotype. *J. Gen Plant Pathol* 72: 6-15

- Soylu S, Brown I, Mansfield JW.** (2005) Cellular reactions in *Arabidopsis* following challenge by strains of *Pseudomonas syringae*: from basal resistance to compatibility. *Physiol Mol Plant Pathol* 66: 232-243
- Thoma I, Loeffler C, Sinha AK, Gupta M, Krischke M, Steffan B, Roitsch T, Mueller MJ.** (2003) Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J* 34: 363-375
- Van Breusegem F, Dat JF.** (2006) Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol* 141: 384-39
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ.** (2006) Significance of inducible defence-related proteins in infected plants. *Ann Rev of Phytopathol* 44: 135-162
- Vandenabeele S, Vanderauwera S, Vuylsteke M, Rombauts S, Langebartels C, Seidlitz HK, Zabeau M, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F.** (2004) Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 39: 45-58
- Velikova V, Yordanov I, Edreva A.** (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci* 151: 151-166
- Wang D, Weaver ND, Kesarwani M, Dong X.** (2005) Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science* 308: 1036-1040
- Wu G, Shortt BJ, Lawrence EB, Elaine EB, Fitzsimmons KC, Shah DM.** (1995) Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7: 1357-1368
- Yalpani N, Silverman P, Wilson TMA, Kleier DA, Raskin I.** (1991) Salicylic Acid is a Systemic Signal and an Inducer of Pathogenesis-Related Proteins in Virus-Infected Tobacco. *Plant Cell* 3: 809-818

Chapitre 3: Approche histochimique et ultrastructurale de l'induction des réactions de défense du palmier dattier par l'acide salicylique

Présentation de la publication 3

Structural and biochemical changes in Salicylic acid-treated date palm roots challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis*

Version électronique « online »

Journal of pathogens Volume 2011, article ID 280481

Doi: 10.4061/2011/280481

Dans des travaux antérieurs nous avons pu mettre en évidence que le traitement des plantules de palmier dattier, inoculées par *Fusarium oxysporum albedinis* (Foa), par l'acide salicylique (SA) a engendré la synthèse de nouveaux composés phénoliques et a stimulé les activités peroxydase et phenylalanine ammonia-lyase. Ces changements biochimiques ont été notés au niveau des racines du palmier dattier près du site d'inoculation de l'agent pathogène. Etant donné la complexité du système racinaire du palmier dattier, il est difficile de caractériser les réactions de défense mises en jeu sans avoir recours à une analyse microscopique convenable. C'est dans ce cadre que ce travail est mené, il se propose d'exploiter les techniques de la microscopie électronique et d'histochimie afin de caractériser les réactions de défense du palmier dattier prétraité par le SA (100 μ M) contre son agent pathogène.

La microscopie électronique nous a révélé qu'en absence du traitement SA, le pathogène colonise la majorité des tissus racinaires, il attaque le parenchyme cortical, l'endoderme et les vaisseaux conducteurs. Il progresse d'une cellule à l'autre en traversant les plasmodesmes mais aussi en dégradant les constituants de la paroi primaire des cellules végétales. Cette dégradation est vraisemblablement le résultat de l'action des enzymes hydrolytiques de l'agent pathogène. La mort des cellules attaquées est signée par une désorganisation cellulaire se traduisant par la formation de nombreuses vésicules qui remplacent les organites cellulaires et occupent une grande partie du cytoplasme.

Lorsque les plantules sont prétraitées par le SA avant leur inoculation par le pathogène, un matériel dense aux électrons est observé, il est déposé au niveau des espaces intercellulaires des tissus racinaires. Ces dépôts ne sont jamais observés dans les tissus des plantes témoins. Le mycélium du pathogène, près de ce matériel, est souvent altéré et désorganisé suggérant que ce matériel pourrait générer un environnement toxique pour l'agent pathogène. Son emplacement dans les espaces intercellulaires laisse penser qu'ils pourraient jouer un rôle

dans l'empêchement de la progression du Foa dans les tissus racinaires. La nature de ce matériel semble être phénolique mais reste à confirmer.

L'exploitation des techniques histochimiques nous a permis d'élucider certaines des réactions de défense du palmier dattier contre son agresseur et de préciser les tissus racinaires impliqués dans cette défense. Ces réactions incluent l'induction des peroxydases, des flavonoïdes et des protéines. Tous les résultats obtenus confirment que les réactions de défense du palmier dattier activées à la suite du traitement SA sont plus prononcées après l'inoculation de l'agent pathogène.

Concernant les protéines induites, elles ont été localisées au niveau des couches cellulaires entourant les vaisseaux du xylème et au niveau de certaines cellules situées près de l'endoderme et sont positivement corrélées avec l'établissement de la résistance.

L'activité peroxydase a été mise en évidence au niveau du phloème et du parenchyme cortical, elle a été stimulée aussi bien dans les racines traitées par le SA que dans celles inoculées par Foa. Deux nouveaux isomères de peroxydase (32 et 28 kD) ont été révélées par électrophorèse dans les racines des plantules à la fois traitées par le SA et inoculées par le pathogène. Ces peroxydases pourraient intervenir, par peroxydation de certains substrats, dans l'accumulation de composés hautement toxiques pour l'agent pathogène.

Les flavonoïdes, quant à elles, elles ne sont induites que dans les racines qui sont à la fois traitées par le SA et inoculées par Foa. Ces composés phénoliques sont différents des dérivés des acides caféïques révélés dans les tissus racinaires des plantes témoins. Les flavonoïdes sont exprimées dans les parois cellulaires du parenchyme vasculaire du xylème spécifiquement dans les tissus des plantules ayant montré une certaine résistance au Bayoud. La comparaison des résultats de l'histochimie avec celle de la microscopie électronique, porte à croire que les flavonoïdes interviennent, au moins en partie, dans la composition du matériel dense aux électrons.

En conclusion, les résultats de cette étude permettent de confirmer que i) le SA induit des changements structuraux et biochimiques impliquant l'induction des flavonoïdes et des peroxydases, en réponse à l'infection par Foa, ii) ce sont les parenchymes cortical et vasculaire (surtout le parenchyme vasculaire du xylème) qui sont les principaux acteurs de cette réaction de défense du palmier dattier contre son pathogène.

Structural and biochemical changes in Salicylic acid-treated date palm roots challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*

Abdelhi Dihazi^{a, b}, Mohammed Amine Serghini^b, Fatima Jaiti^a, Fouad Daayf^c, Azeddine Driouich^d, Hassan Dihazi^e, Ismail El Hadrami^a

^aLaboratoire de Biotechnologies, Protection et Valorisation des Ressources Végétales, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, B.P. 2390, 40 001, Marrakech-Morocco ; ^bLaboratoire de Biotechnologie et de Valorisation des Ressources Naturelles, Université Ibn Zohr, Faculté des Sciences, Agadir-Morocco; ^cDepartment of Plant Science, University of Manitoba, Winnipeg MB, Canada ; ^dLaboratoire Glyco-MEV, Université de Rouen, France; ^eUniversity of Göttingen, Germany.

*Corresponding author: dihazi_abdel@yahoo.fr

Abstract

Histochemical and ultrastructural analyses were carried out to assess structural and biochemical changes in date palm roots pre-treated with salicylic acid (SA) then inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa). Flavonoids, induced proteins and peroxidase activity were revealed in root tissues of SA-treated plants after challenge by Foa. These reactions were closely associated with plant resistance to Foa. Host reactions induced after inoculation of SA-treated plants with Foa included the plugging of intercellular spaces, the deposition of electron-dense materials at the sites of pathogen penetration and several damages to fungal cells. On the other hand, untreated inoculated plants showed marked cell wall degradation and total cytoplasm disorganization, indicating the protective effects provided by salicylic acid in treated plants.

Key words: Date palm, Salicylic acid, Flavonoids, PR-proteins, Peroxidase, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*.

1. Introduction

Fusarium wilts are economically important soil borne diseases that result in significant crop losses and damage to natural ecosystems. Bayoud is a vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa) and it is the most serious fungal disease threatening date palm plantations in North Africa, especially in Morocco. Resistance to the pathogen is found only in a few cultivars of date palm, which unfortunately produce poor quality fruit [1]. A promising strategy for reducing diseases is based on the induction of resistance by challenging plants with defence elicitors. Plant defence mechanisms are represented by a number of

structural and biochemical changes such as phytoalexin synthesis [2], callose deposition [3], cell wall lignification [4] and pathogenesis-related (PR) proteins induction [3]. However, these reactions do not always correlate with disease prevention. Among others, salicylic acid (SA) is known to be involved in regulating plant defences [5, 6]. Although the mechanism of SA-mediated plant defence is not completely understood in all crops, its central role in plant defence is well established [6-8]. Accumulation of SA has been shown to be crucial for the expression of PR proteins [9] which have antimicrobial activity and thought to be involved in plant resistance. Among them, peroxidases were described in plant defence against both necrotrophic and biotrophic pathogens [10]. Peroxidases can generate a physical barrier to prevent the penetration of the pathogen into the host tissues; it catalyzes the H₂O₂-dependent cross-linking of cell wall components leading to cell wall lignification [11].

In the date palm-Foa pathosystem, the first report confirming the involvement of SA in plant defence was by Dihazi et al. [12], who showed that application of SA activated the metabolism of phenolic compounds and induced the biosynthesis of some hydroxycinnamic acid derivatives then described as sinapic acid derivatives [13].

Flavonoids are also detected in plant cell walls in interactions with a resistance outcome [14] and their concentration increased significantly in clover roots in response to infection with *Pythium ultimum* [15]. In the date palm-Foa pathosystem, flavonoids have been described in the roots by Ziouti et al. [16] and were correlated to date palm callus defence against Foa [17]. Given the complexity of the root system of date palm plants, it is difficult to understand the role of the above-noted defence responses without a microscopic analysis of their effects in-situ. Therefore, the objective of the present work was to contribute a cytological investigation to studies on the mechanisms involved in SA-induced defence reactions. We investigated both structural and biochemical changes involved in conferring resistance to date palm cultivar Jihel against Foa after treatment with SA. These included induced phenolics (i.e., flavonoids) as well as induced activity of peroxidase. Furthermore, an ultrastructural analysis was carried out with the aim to elucidate the role of SA in events involved in resistance of date palm towards Foa.

2. Materials and methods

2.1. *Plant inoculation with Foa and SA treatment*

We used 6-month-old date palm seedlings obtained from seeds produced by cultivar Jihel, highly susceptible to Foa wilt. They were grown in a greenhouse (16 h photoperiod), and then

inoculated by injecting 10 µl of Foa conidial suspension (6×10^6 spores.ml⁻¹) into the roots. The inoculum was prepared using the strain ZAG known for its aggressiveness [18]. Seedlings were treated with SA (100µM) by soaking their roots in a SA solution three days before infiltration with the inocula. Two groups of treated plants were considered, inoculated (TI) and uninoculated (TU). Control treatments were untreated inoculated (UI) and untreated uninoculated (UU) plants. Plant material was collected, 15 days after inoculation, from areas with necrotic lesions when disease symptoms became visible.

2.2. *Staining of proteins*

Roots were fixed overnight at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ in a solution of 2% glutaraldehyde, 2% Paraformaldehyde, 1% Caffeine, 0.2 M Phosphate buffer (pH 7.2). Tissues were dehydrated in a graded ethanol series, and embedded in resin (Technovit7100). Sections (3 µm) were double-stained in Periodic Acid–Shiff (PAS) reagent and Naphthol Blue-Black (NBB). Soluble and reserve proteins were specifically stained in dark blue with NBB [19] and PAS stains starch reserves and cell walls pink [20]. Images were examined by conventional light microscopy.

2.3. *Peroxidase activity*

2.3.1 *Histolocalization of peroxidase activity*

Histological staining for peroxidase activity was carried out using the protocol described by Gahan [21]. Sections from date palm root tissues were fixed for 1 hour in 4% paraformaldehyde in 0.2 M potassium phosphate buffer pH 7.2. Staining was done by incubation of the sections in Tris-HCl buffer 0.05 M, pH 7.6 containing $1.4 \cdot 10^{-3}$ M diaminobenzidine (DAB), 2% H₂O₂ (1%) and 10^{-1} M 3-amino-1,2,4triazole. Images were examined using conventional light microscopy.

2.3.2 *SDS-PAGE of peroxidases*

SDS-PAGE of peroxidases was carried out using acrylamide-bisacrylamide (30 – 0.8) gels as described by Baaziz [22]. Enzyme extraction was conducted with potassium phosphate buffer (pH 7.2) containing 4% polyvinylpyrrolidone. For each treatment, root tissues (200 mg Fresh Weight) of three seedlings were collected from areas with necrotic lesions and then homogenized in 1ml of the buffer solution. The homogenate was centrifuged at 10 000 g for 30 min and the supernatant was used as the enzyme extract. All steps were run at 4°C .

Twenty μ l of enzyme extract were subjected to electrophoresis. Electrophoretic separation was carried out at constant current of 60 mA for 2–3 h. The electrophoresis buffer was TGS (Tris-Glycine-SDS) pH 8.1. Peroxidase activity was visualized in gels using diaminobenzidine and H_2O_2 in 0.2 M acetate buffer, pH 5. The reaction was stopped by removing the substrates and rinsing the gels with water. The SDS-PAGE experiments were repeated twice to confirm the reproducibility of the method.

2.4. Histolocalization of phenolic compounds

Small sections of date palm roots were embedded in 3 % agarose. Transverse sections (30 μ m thickness) were cut using a freezing-stage microtome. After staining with the different reagents, the sections were mounted in the reagents solution. Sections were viewed using a light microscope equipped with a blue filter set at a 420nm excitation and a 515-560 nm barrier filter. Neu's reagent [23], a standard reagent for phenolic compounds, was used. Transverse sections were immersed 2-5 min in 1% 2-amino-ethyldiphenylborinate (Fluka) in absolute methanol and then mounted in a glycerine–water (15/85, v/v) solution, and examined using fluorescence microscopy. In the presence of Neu's reagent, the fluorescence of caffeic acid derivatives and flavonoids became greenish yellow and bright orange, respectively, under blue light.

2.5. Electron microscopy

For transmission electron microscopy (TEM), samples were preserved by quick fixation in 3% (v/v) glutaraldehyde in a 0.1 M cacodylate buffer pH 7.2 for 12 h at room temperature. After rinsing them three times with the fixing cacodylate buffer, samples were post-fixed for 2 h at room temperature in darkness in 1% OsO₄ prepared in cacodylate buffer. The samples were then dehydrated in a series of ethanol solutions to 100%, infiltrated and embedded in Spurr's low viscosity epoxy resin [24]. Samples were processed using a Reichert-ultracut S microtome. Sections were contrasted with uranyl acetate for 30 min and lead citrate for 30 min in darkness. Analyses were carried out using a transmission electron microscope (Jeol 100 EX (Tokyo, Japan).

Statistical analysis

For the groups of treatment (UU, UI, TU, TI), 13 sections were used for each group and experiment repeated twice. The The percentage of sections that showed proteins, flavonoids

and peroxidase activity was calculated, significant differences were recorded between TI and UU treatments at $\alpha = 0.05$ using chi-square test for goodness-of-fit (SPSS Statistics 17,0).

Results

2.3. SA treatment and symptomatology

Both SA-treated and non-treated plants were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* to determine their susceptibility to fungal attack. Typical disease symptoms, mainly characterized by the formation of enlarged brownish lesions at the sites of fungal contact, were visible by 15 d after inoculation (d.a.i.) in control plants. In contrast, treatment with 100 μ M SA resulted in much less disease development than in non-treated date palm plants. Treated inoculated plants generally developed limited necrotic lesions, which reflected a delay in the colonization of the host plant by the pathogen (Figure 1).

2.4. Histological observations of infected date palm root tissues (Fig. 2b)

Observations of transversally sectioned root samples from non-treated plants that were inoculated with Foa showed that all tissues were massively invaded by the pathogen except for the sclerenchyma, which was seldom colonized. Root tissues were intensely colonized as evidenced by the presence of pathogen hyphae through the cortex, the endodermis and the vascular stele.

2.5. Histochemical features of SA-induced defence reactions

2.5.1. Staining of induced-proteins

Histochemical analysis confirmed the expression of induced proteins in SA-treated plants inoculated or uninoculated with Foa (Fig. 2c, 2d). The proteins (stained in dark blue with NBB) were strongly expressed at the cell layer surrounding the xylem vessels and in some parenchyma cells near the endodermis. Control plants had impaired protein production (Fig. 2a, 2b).

2.5.2. Peroxidase activity

Peroxidase activity revealed by brown deposits after DAB staining was noted in SA-treated plants both inoculated (85%) and uninoculated (60%) with Foa and also in untreated inoculated ones (70%). Such activity was localized in the cell walls and in the intercellular spaces of both the cortical parenchyma cells and the phloem tissues (Fig. 3b, 3c, 3d).

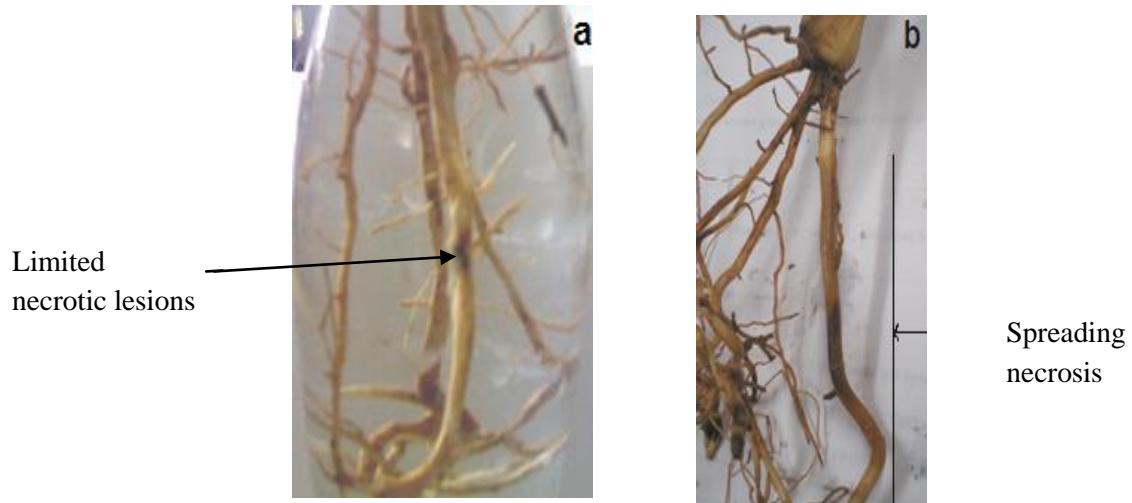


Figure 1: Without SA treatments, diseased control plants showed progressing wet necrosis of the roots (b). In contrast, after SA treatment, plants developed limited necrotic lesions (a)

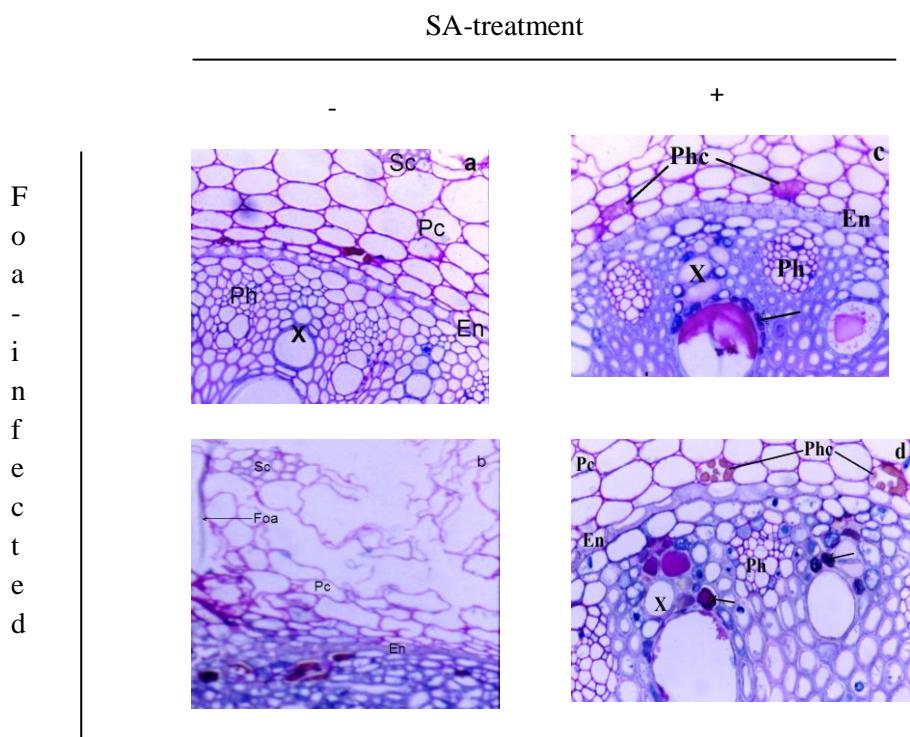


Figure 2: Light micrographs of samples from JHL date palm root tissues inoculated by *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa) ($\times 40$). Proteins were specifically stained in dark blue with NBB and PAS stains starch reserves and cell walls in pink. a: control roots (UU); b: Untreated and infected roots (UI); c: SA-treated roots (TU); d: SA-treated and Foa-infected roots (TI), note the presence of proteins at the cell layer surrounding the xylem vessels (arrow). X: xylem vessels, Ph: Phloem tubes, Pc: cortical parenchyma, Phc: Phenolic-storing cells.

In roots from control plants, such an activity was rather low (23%) (Fig. 3a). In addition, SDS-PAGE analysis (Fig. 4) confirmed this result; in Foa-infected plants two peroxidases isozymes with MM values of 150 and 142 kD were markedly expressed. These isozymes are present in trace amounts in untreated uninoculated plants and clearly decrease both in SA-treated and in SA-treated and inoculated ones. Interestingly, two additional isozymes with MM values of 32 and 28 kD were expressed only in SA-treated and inoculated plants and suggested that the activation of peroxidase with SA was more pronounced in infected plants.

2.5.3. Histochemical staining of phenolic compounds

Neu's reagent is a standard histochemical reagent for many phenolic compounds. It stains flavonoids and caffeic acid derivatives bright-orange and green yellow, respectively. It forms complexes with such phenolics which then emit a specific fluorescence. In date palm root controls treated with the Neu's reagent, a greenish yellow fluorescence was observed under blue light in sclerenchyma, endodermis, and vascular parenchyma cell walls. These caffeic acid derivatives revealed might be involved in lignification processes. When plants were inoculated with Foa, a decrease in this specific fluorescence was observed and a brownish color appeared in cells located near the xylem vessels (Fig. 5b). When plants were treated with SA and challenged by Foa, flavonoids were induced (75%) (bright orange fluorescence) in the vascular-parenchyma cell walls near the xylem vessels (Fig. 5d), probably at sites of potential pathogen penetration. Their presence might be associated with their involvement in plant defence.

2.5.4. Ultrastructural features of infected date palm roots and SA-induced defence reactions

Close examination of infected roots' ultrastructure showed that pathogen ingress toward the vascular stele coincided with extensive vascular disorganization and marked cell alterations of the cytoplasm which was frequently reduced to vesicular remnants (Fig. 6d). The colonization was characterized by a marked deterioration of the cell walls resulting in its complete dissolution (Fig. 6c) as compared to the preserved cell-walls in uninoculated roots (Fig. 6a). In all cases, the observed pattern of fungal colonization and host cell disorganization coincided with the occurrence of macroscopically visible symptoms along the roots, leading to severe plant wilting and eventually plant death. Fungal growth was mainly intracellular but it could also occur intercellularly through direct host wall penetration.

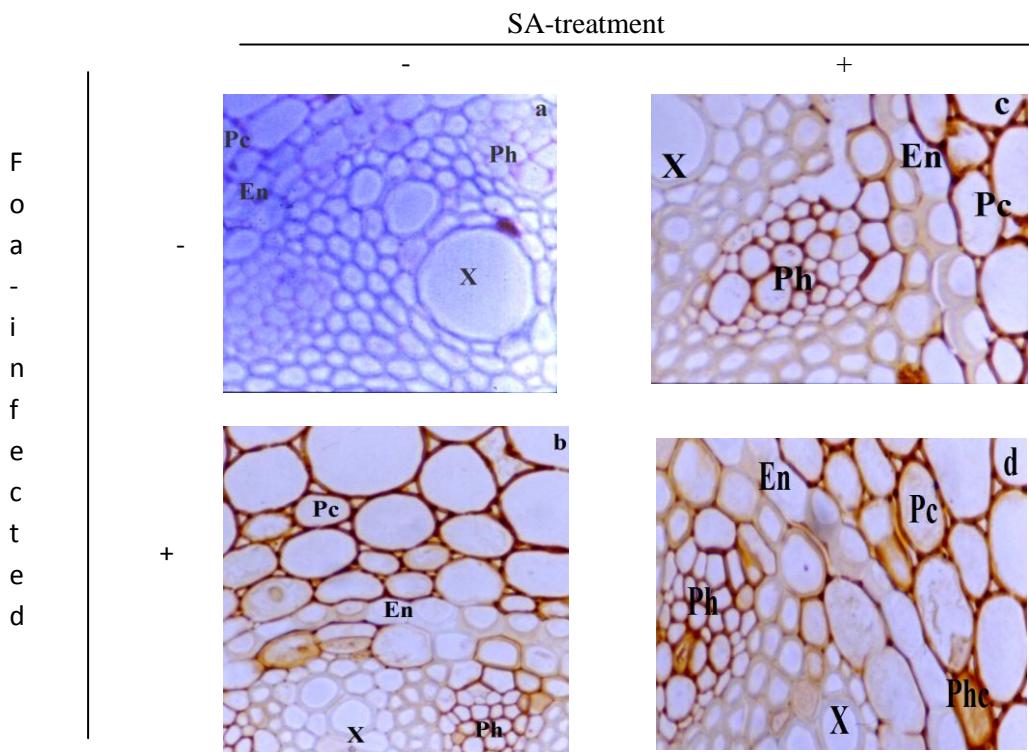


Figure 3: Cytochemical localization of peroxidase activity in date palm root tissues of JHL cultivar revealed by brown deposits after DAB staining. (a): control plants (UU; $\times 40$); (b): infected plants (UI; $\times 60$); (c): SA-treated roots (TU; $\times 60$); (d): SA-treated and *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*-infected plants (TI; $\times 60$). X: xylem vessels; Ph: phloem; En: endodermic cells; Pc: cortical

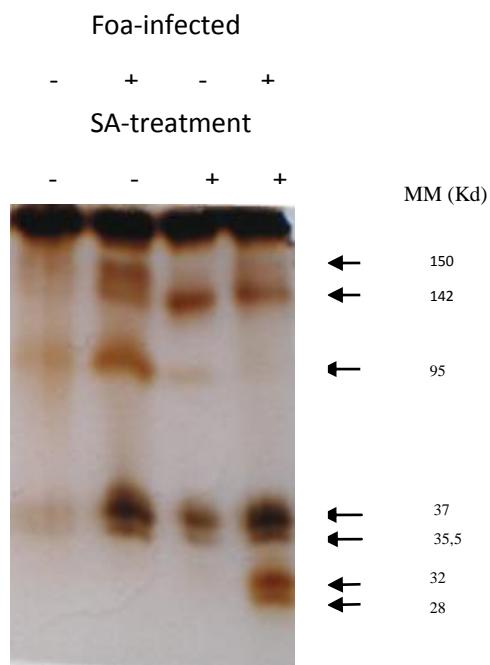


Figure 4: SDS-PAGE of peroxidase activity in roots of date palm Jihel cultivar visualized using DAB staining in response to treatment by salicylic acid (100 μM) and inoculation with *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* at the 15th day after inoculation.

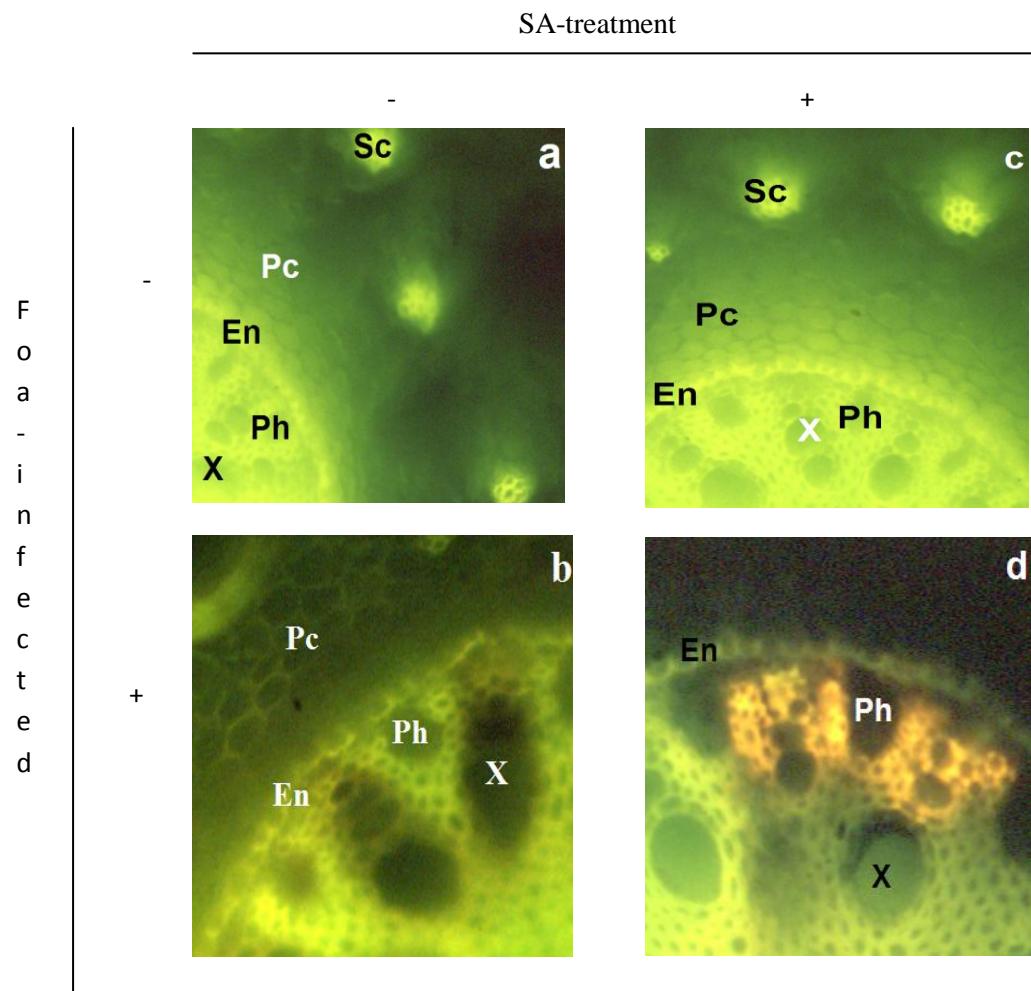


Figure 5: Histochemical localization of caffeic acid derivatives and flavonoids in date palm root tissues stained with Neu's reagent under Blue light (green yellow and bright-orange, respectively). (a \times 20): control roots (UU), caffeic acid derivatives were observed at sclerenchyma, endodermis and vascular parenchyma cell walls; (b \times 40): inoculated roots (UI), a dark zone appeared in cells situated near the xylem vessels. (c \times 20): SA-treated roots (TU); (d \times 40): SA-treated and *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*-infected roots (TI), note the presence of flavonoids in the vascular-parenchyma cell walls near the xylem vessels. X: xylem vessels; Ph: phloem; En: endodermic cells; Pc: parenchyma cells; Sc: sclerenchyma cells.

The germ-tube attempts to cross the host cell walls occurred preferably through the plasmodesmata at pit fields lacking secondary wall material (Fig. 6b, 6h).

In SA-treated plants, the colonization by *Foa* differed markedly from that observed in control plants. Fungal growth was reduced and hyphae were seldom seen in the tissues of the host roots. One of the most striking changes observed in SA-treated plants as compared with controls was the elaboration of several host defence reactions that included the deposition of an electron-dense material closely associated with the cell walls (Fig. 6f). This material forms a coat in the vessel lumen (Fig. 6g) and at sites of intercellular spaces leading to plug them (Fig. 6e) and eventually to alter the invading hyphae (Fig. 6h). Wall appositions were also observed at sites of pathogen invasion (Fig. 6f). These structures were associated with fungal cell walls' distortion, breakdown of the plasma membrane and an apparent densification of the cytoplasm (Fig. 6h). They are probably meant to strengthen the host cell walls and to prevent the pathogen from spreading.

3. Discussion

We have previously described the role of SA in enhancing the survival of *Foa*-infected date palm plants by triggering the synthesis of new phenolic compounds [12] which were identified as hydroxycinnamic acid derivatives [13, 25]. To our knowledge, this is the first report showing the effects of SA on the cytochemical changes of the root tissues in the date palm-*Foa* interaction. These results suggest that SA induced protein synthesis in both inoculated and uninoculated plants, especially in the cell layer surrounding the xylem vessels and also in vascular parenchyma cells located near the endodermis and in some cortical parenchyma cell walls. The proteins induced in response to SA treatment were strongly expressed in asymptomatic date palm plants and could play a role in resistance. In non-treated inoculated plants, these proteins were present, but not enough to stop the spreading of the pathogen and several signs of tissue alterations were noted.

In agreement with earlier studies [12], the present results confirmed that defence reactions in SA-treated plants were more pronounced after fungal challenge. Moreover, we have shown that both SA-treated plants and the infected ones have expressed high peroxidase activity, with two isozymes (150 and 142 kD) in inoculated plants that disappear in SA-treated ones and two new isozymes (32 and 28 kD) expressed only in SA-treated and inoculated plants.

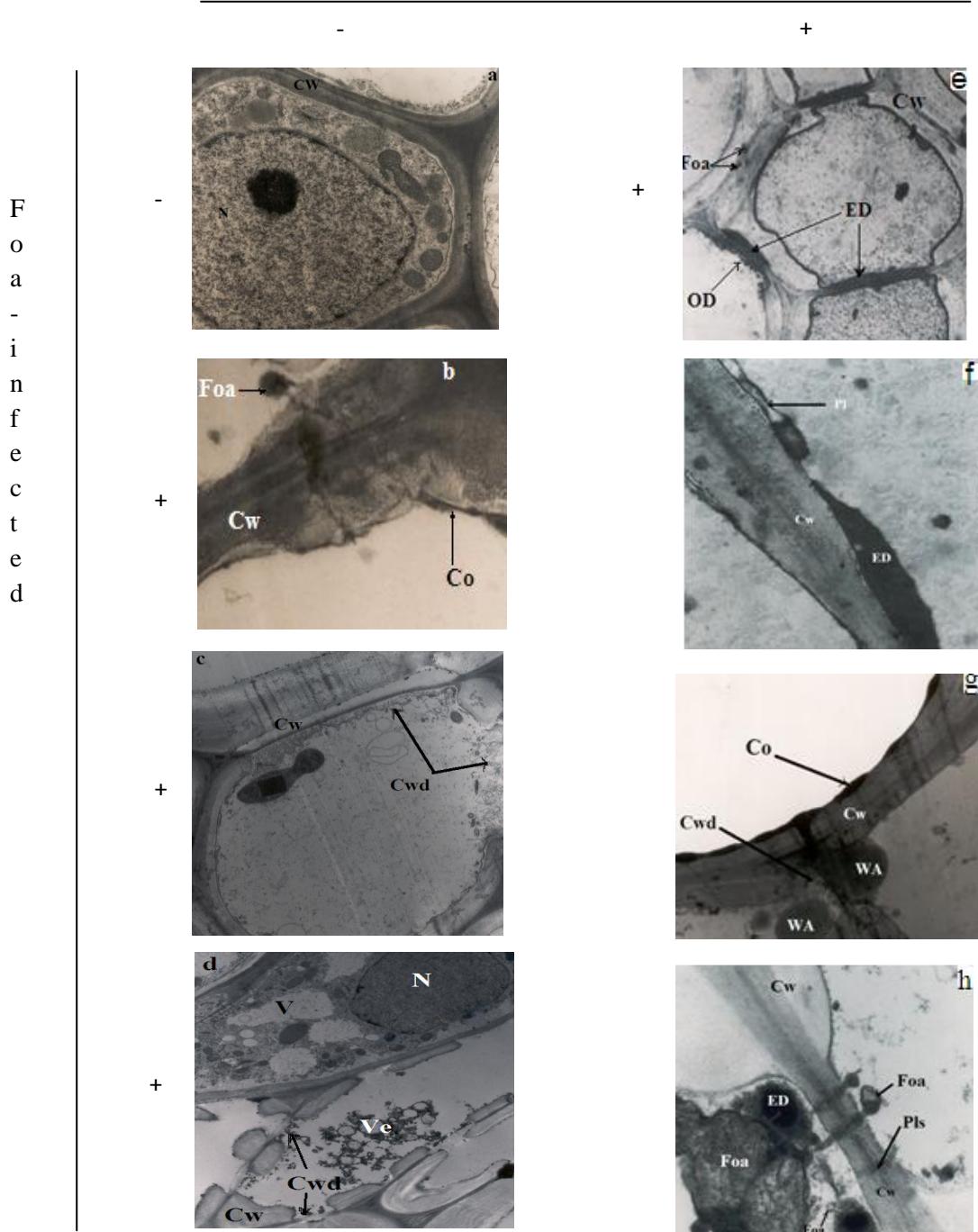


Figure 6: Transmission electron micrographs of date palm root tissues treated with SA and infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa). (a \times 5000): Preserved cell wall (Cw) in control roots (UU); (b \times 20000), (c \times 6000), (d \times 5000): Untreated inoculated roots (UI), note the marked cell wall degradation (c) as well as the alteration of the cytoplasm, which was reduced to vesicular remnants (d). (e \times 6000), (f \times 12000), (g \times 12000), (h \times 30000) : SA-treated and infected plants, note the accumulation of the electron-dense material (ED) (f), which forms a coat (Co) in the vessel lumen (g) and osmiophilic droplets (OD) at sites of intercellular spaces of parenchyma cells (e). Note also the wall appositions (WA) (g) and the disruption of the Foa hypha near the electron-dense material (ED) (h). Cw: cell walls, Ve: vesicles, Co: coat, Cwd: cell wall degradation, Pl: plasmalemma, Pls: plasmodesmata, N: nuclei, Foa: *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*.

The expression of these new isozymes only in inoculated and SA-treated plants may constitute a sort of “priming” of date palm plants toward its pathogen.

This corroborates other findings that correlated date palm resistance against Foa with peroxidase activity [26-28]. Indeed, Jaiti et al. [28] had shown that jasmonic acid increased the peroxidase activity in date palm plants after Foa infection. Peroxidases are frequently responsive to SA, or jasmonic acid [29] and it is widely known that they play a central role in host plant defences against pathogens [10]. Peroxidases may be involved in the peroxidation of substrate molecules, leading to the accumulation of highly toxic compounds, which may contribute to resistance via their antifungal potential [30]. Interestingly, a high peroxidase activity was detected in the phenolic-storing cells, especially in SA-treated date palm roots.

Furthermore, salicylic acid is known to repress some jasmonic acid pathway-related defence mechanisms [31, 32]. This may explain the presence of isozymes in inoculated plants then their absence after SA treatment. Why some isoforms of peroxidase are induced while others are repressed remains to be determined.

In addition, histochemical analysis showed that flavonoids accumulated only in SA-treated and Foa-inoculated plants and filled the vascular parenchyma cell walls. This confirms the implication of SA in sensitizing date palm plants to respond faster to its pathogen. The involvement of flavonoids in plant defence reactions is well documented [33]. These phenolics are different from those revealed in date palm root controls which were caffeic acid derivatives. Flavonoids were considered as important phenolic compounds detected in plant cell walls in resistant interactions [14]. Their accumulation has occurred only in the resistant cotton variety inoculated with the pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *Malvacearum* [14]. More recently, Carlsen et al. [15] have shown that the concentrations of flavonoids formononetin and daidzein increased significantly in clover roots in response to infection with *Pythium ultimum*. Dixon [34] confirmed the antimicrobial action of flavonoids during plant-fungal pathogen defence responses. McNally et al. [35], using the *Podosphaera xanthii*-cucumber interaction, have also localized the production of C-glycosyl flavonoids in resistant plants. More recently, El Hadrami et al. [36] have shown the involvement of rutin in the interaction between potato and *Verticillium dahliae*.

In the date palm-Foa pathosystem, flavonoids have been detected in trace amounts in date palm roots [16] and have been suggested to play a role in date palm callus defence against Foa [17], but none of the previously published studies has reported the involvement of SA in triggering the accumulation of flavonoids related to date palm plant defence. Our data suggest

that flavonoids were expressed after SA treatment in the cell walls of vascular parenchyma cells closely associated with the xylem vessels especially in tissues around the necrotic zone and this is associated with plant resistance. Dai et al. [37] have reported that the necrosis formations may come from the action of peroxidase on flavonoids during the lignification process.

To investigate whether the observed biochemical changes correlate with the structural modifications, date palm root tissues were examined at the ultrastructural level. In non-treated date palm plants, all root tissues were strongly colonized by Foa. Pathogen ingress into the vascular stele was characterized by severe host cell alterations, including cell wall degradation and alteration of the cytoplasm, which was frequently reduced to vesicular remnants. This may suggest that the fungus produces cell wall hydrolytic enzymes that hydrolyze host components and lead to fungal spread into the root tissues. Such enzymes were previously described in date palm-Foa interaction and were correlated to disease development [38]. The protection against Foa in SA-treated date palm plants was associated with a deposition of an electron-dense material, a wall apposition in host cells, and an increase in damaged fungal cells. This electron-dense material was closely associated with intercellular spaces, known to be strategic sites for pathogen spread. Such host reactions, obviously designed to halt pathogen ingress, were never seen in control plants. Fungal cells, near these electron-dense materials, were frequently disorganized, suggesting a fungitoxic environment generated by this material [39]. The nature of this material is not yet determined. Its reactivity to osmium tetroxide indicates that these compounds are possibly of phenolic nature [40]. The accumulation of phenolic compounds in the host cell walls may contribute to enhancing the mechanical strength of these defensive barriers. According to our cytochemical observations, the electron-dense material formed in SA-treated root tissues could include flavonoids. Interestingly, in banana roots attacked by the nematode *Radopholus similis*, electron-dense materials have been associated with the impregnation of cell walls by flavonoids previously detected by histochemical analysis [41]. The same result was found in cotton leaves infected by *Xanthomonas campestris* pv. *Malvacearum* [14]. The nature of the wall apposition formed after SA treatment is also not yet determined but their involvement in pathogen attack was demonstrated since fungal cells near these wall appositions were altered. Several reports indicated that wall appositions contain callose and cellulose, as revealed by cytochemical analysis [42]. Such cellular changes led to several barriers preventing pathogen spread in the root tissues.

Conclusion

During this study, conclusive results were obtained. They provide evidence that SA-treatment induces structural and biochemical changes in date palm roots in response to fungal infection. Cortical and vascular-parenchyma cells are the main cells involved in SA-induced response leading to the accumulation of flavonoids and other phenolic compounds, as well as the induction of new isomers of peroxidase. This confirms the possible implication of SA in triggering date palm defence against its pathogen and confers a promising strategy for effective control of the bayoud disease.

Acknowledgements

Financial support for this work was provided by PRAD 11-05-Egide N°24172UL, PRAD 06-02, Protars II N° P15/14, AI (France-Maroc) 01/23; ARP-AUFN°D2092RR707; and AI (Tunisie-Maroc) 24/02. DMK (Deutsch-Marokkanisches Kompetenznetzwerk) is gratefully acknowledged.

Références

- [1] M. Saaidi, "Field behaviour of 32 date palm cultivars towards Bayoud: a 25-year survey," *Agronomie*, vol. 12, no. 5, pp. 359–370, 1992.
- [2] K. Serghini, A. Pérez de Luque, M. Castejon-Munoz, L. Garcia-Torres, and J. V. Jorrín, "Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (*Orobanche cernua* Loefl.) parasitism: induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins," *Journal of Experimental Botany*, vol. 52, no. 364, pp. 2227–2234, 2001.
- [3] A. Pérez-de-Luque, C. I. González-Verdejo, M. D. Lozano et al., "Protein cross-linking, peroxidase and β -1,3-endoglucanase involved in resistance of pea against *Orobanche crenata*," *Journal of Experimental Botany*, vol. 57, no. 6, pp. 1461–1469, 2006.
- [4] A. Pérez-de-Luque, D. Rubiales, J. I. Cubero et al., "Interaction between *Orobanche crenata* and its host legumes: unsuccessful haustorial penetration and necrosis of the developing parasite," *Annals of Botany*, vol. 95, no. 6, pp. 935–942, 2005.
- [5] J. Glazebrook, "Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*—2001 status," *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 4, no. 4, pp. 301–308, 2001.
- [6] M. Grant and C. Lamb, "Systemic immunity," *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 9, no. 4, pp. 414–420, 2006.
- [7] C. M. J. Pieterse and L. C. Van Loon, "Salicylic acidindependent plant defence pathways," *Trends in Plant Science*, vol. 4, no. 2, pp. 52–58, 1999.

- [8] J. Shah, “The salicylic acid loop in plant defense,” *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 6, no. 4, pp. 365–371, 2003.
- [9] N. Yalpani, P. Silverman, T. M. A. Wilson, D. A. Kleier, and I. Raskin, “Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco,” *Plant Cell*, vol. 3, no. 8, pp. 809–818, 1991.
- [10] L. C. Van Loon, M. Rep, and C. M. J. Pieterse, “Significance of inducible defense-related proteins in infected plants,” *Annual Review of Phytopathology*, vol. 44, pp. 135–162, 2006.
- [11] L. Almagro, L. V. Gomez Ros, S. Belchi-Navarro, R. Bru, A. Ros Barcelo, and M. A. Pedreno, “Class III peroxidases in plant defence reactions,” *Journal of Experimental Botany*, vol. 60, no. 2, pp. 377–390, 2009.
- [12] A. Dihazi, F. Jaiti, J. Zouine, M. El Hassni, and I. El Hadrami, “Effect of salicylic acid on phenolic compounds related to date palm resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*,” *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 42, no. 1, pp. 9–16, 2003.
- [13] I. E. Hadrami, T. Ramos, M. E. Bellaj, A. E. Idrissi-Tourane, and J. J. Macheix, “A sinapic derivative as an induced defence compound of date palm against *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, the agent causing bayoud disease,” *Journal of Phytopathology*, vol. 145, no. 8-9, pp. 329–333, 1997.
- [14] G. H. Dai, M. Nicole, C. Andary et al., “Flavonoids accumulate in cell walls, middle lamellae and callose-rich papillae during an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and cotton,” *Physiological and Molecular Plant Pathology*, vol. 49, no. 5, pp. 285–306, 1996.
- [15] S. C. K. Carlsen, A. Understrup, I. S. Fomsgaard, A. G. Mortensen, and S. Ravnskov, “Flavonoids in roots of white clover: interaction of arbuscular mycorrhizal fungi and a pathogenic fungus,” *Plant and Soil*, vol. 302, no. 1-2, pp. 33–43, 2008.
- [16] A. Ziouti, C. El Modafar, A. Fleuriel, S. El Boustani, and J. J. Macheix, “Phenolic compounds in date palm cultivars sensitive and resistant to *Fusarium oxysporum*,” *Biologia Plantarum*, vol. 38, no. 3, pp. 451–457, 1996.
- [17] F. Daayf, M. El Bellaj, M. El Hassni, F. J'Aiti, and I. El Hadrami, “Elicitation of soluble phenolics in date palm (*Phoenix dactylifera*) callus by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* culture medium,” *Environmental and Experimental Botany*, vol. 49, no. 1, pp. 41–47, 2003.
- [18] A. El Idrissi-Tourane, A. Oihabi, and I. El Hadrami, “Effet des polyamines et des inhibiteurs de leur biosynthèse sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f. sp.

albedinis, agent causal du bayoud,” *Revue du Réseau pour l’Amélioration de la Productivité Agricole en Milieu Aride*, vol. 7, pp. 241–247, 1995.

[19] D. B. Fisher, “Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy,” *Histochemistry*, vol. 16, no. 1, pp. 92–96, 1968.

[20] R. Martoja and M. Martoja, “Réactions basées sur une oxydation suivie d'une mise en évidence des carbonyles formés,” in *Initiations aux Techniques de l’Histologie Animale*, pp. 154–162, Masson et Cie, Paris, France, 1967.

[21] P. B. Gahan, *Plant Histochemistry and Cytochemistry: An Introduction*, Academic Press, London, UK, 1984.

[22] M. Baaziz, “The activity and preliminary characterization of peroxidase in leaves of cultivars of date palm, *Phoenix dactylifera* L. ,” *New Phytologist*, vol. 111, pp. 403–411, 1989.

[23] R. Neu, “A new reagent for differentiating and determining flavones on paper chromatograms,” *Naturwissenschaften*, vol. 43, p. 82, 1957.

[24] A. R. Spurr, “A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electronmicroscopy,” *Journal of Ultrastructure Research*, vol. 26, no. 1-2, pp. 31–43, 1969.

[25] I. El Hadrami, “Infections racinaires localisées et rôle des dérivés hydroxycinnamiques dans la résistance du palmier dattier (*Phenix dactilyfera* L) au *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal du bayoud,” *Polyphenols Actualités*, vol. 22, pp. 19–26, 2002.

[26] M. El Hassni, F. J'Aiti, A. Dihazi, E. Ait Barka, F. Daayf, and I. El Hadrami, “Enhancement of defence responses against Bayoud disease by treatment of date palm seedlings with an hypoaggressive *Fusarium oxysporum* isolate,” *Journal of Phytopathology*, vol. 152, no. 3, pp. 182–189, 2004.

[27] A. Dihazi and I. El Hadrami, “Changes in peroxidases and phenylalanine ammonia-lyase activities in date palm seedlings treated by salicylic acid and inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, Polyphenols communications, Salamanca,” *Spain*, vol. 1, pp. 385–386, 2008.

[28] F. Jaiti, J. L. Verdeil, and I. El Hadrami, “Effect of jasmonic acid on the induction of polyphenoloxidase and peroxidase activities in relation to date palm resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*,” *Physiological and Molecular Plant Pathology*, vol. 74, no. 1, pp. 84–90, 2009.

[29] M. El-Sayed and R. Verpoorte, “Growth, metabolic profiling and enzymes activities of Catharanthus roseus seedlings treated with plant growth regulators,” *Plant Growth Regulation*, vol. 44, no. 1, pp. 53–58, 2004.

- [30] E. W. B. Ward, “Biochemical mechanisms involved in resistance of plants to fungi,” in *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions*, J. A. Baily, Ed., pp. 107–131, Springer-K.G., Berlin, Germany, 1986.
- [31] S. H. Spoel, A. Koornneef, S. M. C. Claessens et al., “NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol,” *Plant Cell*, vol. 15, no. 3, pp. 760–770, 2003.
- [32] M. El-Oirdi, T. A. El-Rahman, L. Rigano et al., “*Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in Tomato,” *Plant Cell*, vol. 23, no. 6, pp. 2405–2421, 2011.
- [33] R. L. Nicholson and R. Hammerschmidt, “Phenolic compounds and their role in disease resistance,” *Annual Review of Phytopathology*, vol. 30, pp. 369–389, 1992.
- [34] R. A. Dixon, “Isoflavonoids: biochemistry, molecular biology and biological functions,” in *Comprehensive Natural Products Chemistry*, U. Sankawa, Ed., pp. 773–823, Elsevier, Amsterdam, 1999.
- [35] D. J. McNally, K. V. Wurms, C. Labbé, and R. R. B  langier, “Synthesis of C-glycosyl flavonoid phytoalexins as a site specific response to fungal penetration in cucumber,” *Physiological and Molecular Plant Pathology*, vol. 63, no. 6, pp. 293–303, 2003.
- [36] A. El Hadrami, L. R. Adam, and F. Daayf, “Biocontrol treatments confer protection against *Verticillium dahliae* infection of potato by inducing antimicrobial metabolites,” *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 24, no. 3, pp. 328–335, 2011.
- [37] G. H. Dai, C. Andary, L. Mondolot-Cosson, and D. Boubals, “Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V.rupestris* and *V.rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*,” *Physiological and Molecular Plant Pathology*, vol. 46, no. 3, pp. 177–188, 1995.
- [38] C. El Modafar and E. El Boustani, “Relationship between cell wall susceptibility to cellulases and pectinases of *Fusarium oxysporum* and susceptibility of date palm cultivars,” *Biologia Plantarum*, vol. 43, no. 4, pp. 571–576, 2000.
- [39] M. Peng and J. Kuc, “Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks,” *Phytopathol*, vol. 82, pp. 696–699, 1992.
- [40] L. Guérin, N. Benhamou, and F. Rouxel, “Ultrastructural and cytochemical investigations of pathogen development and host reactions in susceptible and partially-resistant carrot roots infected by *Pythium violae*, the major causal agent for cavity spot,” *European Journal of Plant Pathology*, vol. 104, no. 7, pp. 653–665, 1998.

- [41] C. Valette, C. Andary, J. P. Geiger, J. L. Sarah, and M. Nicole, "Histochemical and cytochemical investigations of phenols in roots of banana infected by the burrowing nematode *Radopholus similis*," *Phytopathology*, vol. 88, no. 11, pp. 1141–1148, 1998.
- [42] N. Benhamou and R. R. Bélanger, "Benzothiadiazolemediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato," *Plant Physiology*, vol. 118, no. 4, pp. 1203–1212, 1998.

Chapitre 4: Biocontrôle de la maladie du Bayoud par des microorganismes antagonistes du *Fusarium oxysporum albedinis*

Présentation de la publication 4

Use of two bacteria for biological control of Bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* in date palm (*Phoenix dactylifera* L) seedlings

Plant Physiology and Biochemistry, 55 (2012) 7-15

L'impact négatif de l'utilisation massive des pesticides sur l'environnement a poussé la recherche à s'orienter vers la lutte biologique comme stratégie alternative de contrôle des maladies des plantes. Dans le cas de la maladie du Bayoud, le contrôle biologique a été testé en adoptant différentes modalités. Nous avons utilisé des souches hypoagressives de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et des endomycorhizes en vue d'induire les réactions de défense du palmier dattier contre son agresseur. Nous avons aussi sélectionné, par des tests de confrontation *in vitro*, un certain nombre de bactéries qui se sont avérées, avec des degrés différents, antagonistes vis-à-vis du Foa.

Le présent travail se propose de tester deux bactéries dans le contrôle biologique de la maladie du Bayoud causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa). Ces bactéries proviennent du laboratoire des Biopesticides, Centre de Biotechnologie de Sfax de Tunisie. Elles ont été isolées à partir de la rhizosphère des amandiers de la région Sfax et ont montré, dans d'autres pathosystèmes, un certain rôle dans le contrôle des maladies des plantes. Les bactéries utilisées sont *Bacillus amylolequefaciens* strain Ag1 (Ag) et *Burkholderia cepacia* strain Cs5 (Cs), elles ont été examinées pour leur pouvoir inhibiteur du développement du Foa d'une part et pour leur capacité d'induire les réactions de défense du palmier dattier contre son pathogène d'autre part. Les deux bactéries ont montré *in vitro* une capacité d'inhiber la croissance et la sporulation de l'agent pathogène. Le maximum d'inhibition de la croissance a été obtenu au 6^{ème} jour de co-culture avec les bactéries, il est de 83% et de 75% pour les bactéries Cs et Ag respectivement. Alors que l'inhibition de la sporulation a été, au 5^{ème} jour de co-culture avec les bactéries, de 93% et de 86% pour Cs et Ag respectivement. Ces bactéries ont aussi montré une capacité de libérer dans le milieu de culture des composés à activité antifongique capables de limiter la croissance du Foa. En outre, l'observation microscopique a révélé que les bactéries utilisées sont capables d'engendré des vacuolisations et des gonflements au niveau de certaines cellules du mycélium de Foa.

Concernant les tests *in vivo*, nous avons constaté que la taille de la nécrose développée dans les racines du cultivar Jihel sensible au Bayoud, tout autour du site d'infection, a été réduite de plus de 70% pour les plantules inoculées par les bactéries avant d'être infectées par Foa. Lorsque la nécrose est réduite, les plantules ne montrent pas les symptômes de la maladie du Bayoud ce qui laisse penser que l'agent pathogène n'a pas pu coloniser toutes les parties de la plante. Pour comprendre les mécanismes associés à une telle restriction de l'agent pathogène, l'activité peroxydase et la synthèse des composés phénoliques, connues comme marqueurs de la défense du palmier dattier contre le Bayoud ont été testées. Les résultats obtenus ont permis de conclure que ces marqueurs de défense ont été activés à la suite des injections des bactéries dans les racines du palmier dattier, avec une amplification supplémentaire notée dans les racines à la fois infiltrées par les bactéries et inoculées par le pathogène.

Bacillus amylolequefaciens s'est montré beaucoup plus efficace dans la stimulation de l'activité peroxydase dans les racines infectées par Foa (une augmentation de 180% par rapport aux racines témoins) que *Burkholderia cepacia* (une augmentation de 100% par rapport aux racines témoins). Ce résultat est confirmé par l'analyse des gels d'électrophorèse qui nous a révélé que des nouveaux isomères de peroxydase (38kD, 40kD, 50kD) sont exprimés dans les racines qui sont à la fois injectées par les bactéries et inoculées par Foa. Cette stimulation de l'activité peroxydase pourrait intervenir dans le renforcement des parois cellulaires végétales visant empêcher l'invasion des tissus hôtes par le pathogène.

Concernant les composés phénoliques, nous avons pu montrer que le contenu des composés phénoliques solubles a significativement augmenté dans les racines infiltrées par la bactérie Ag avant d'être inoculées par Foa. En outre, l'analyse du profil phénolique par HPLC a montré que l'infiltration des bactéries dans les racines du palmier dattier a induit la synthèse de nouveaux composés phénoliques, identifiés comme des dérivés d'acides hydroxycinnamiques, au dépend des isomères d'acides cafféoylshikimiques normalement présents dans les racines du palmier dattier. Cette induction a été significativement amplifiée après l'inoculation du pathogène. Dans la combinaison *Bacillus amylolequefaciens*/Foa les racines du palmier dattier ont montré une augmentation significative des dérivés d'acides hydroxicinnamiques induits nettement plus importante que celle obtenue avec la bactérie toute seule. Cependant, dans la combinaison *Burkholderia cepacia*/Foa, l'augmentation a concerné les isomères des acides cafféoylshikimiques. Ce résultat nous a fait penser à l'intervention de deux voies dans la réaction de défense du palmier dattier. La première voie nécessite des éliciteurs provenant du pathogène et conduit à l'amplification des isomères d'acides cafféoylshikimiques, alors que la deuxième voie nécessite des éliciteurs bactériens et conduit

à l'induction des dérivés d'acides hydroxicinnamiques. Lorsque les deux types d'éliciteurs sont présents ensemble, l'une des deux voies est stimulée au dépend de l'autre en vue d'engendrer une réaction de défense suffisamment intense pour assurer une amélioration de la résistance à la maladie du Bayoud.

Use of two bacteria for biological control of Bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* in date palm (*Phoenix dactylifera* L) seedlings

Abdelhi Dihazi^{a,c}, Fatima Jaiti^a, Wafa Taktak^b, Olfa kilani Feki^b, Samir Jaoua^f, Azeddine Driouich^d, Mohamed Baaziz^a, Fouad Daayf^e and Mohammed Amine Serghini^{c}

^aLaboratoire de Biotechnologie, Biochimies, Valorisation et Protection des Plantes, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, B.P. 2390, 40 000, Marrakech-Morocco, ^bLaboratoire des Biopesticides, Centre de Biotechnologies de Sfax Tunisia, ^cLaboratoire de Biotechnologie et Valorisation des Ressources Naturelles, Université Ibn Zohr Faculté des Sciences 80060 Agadir-Morocco, ^dLaboratoire Glyco-MEV Université de Rouen, 76821 Rouen France, ^eDepartment of Plant Science, University of Manitoba, Winnipeg MB, Canada R3T 2N2, ^fQatar University, CAS. P.O.Box 2713. Doha, Qatar

*Corresponding author: dihazi_abdel@yahoo.fr

Département de Biologie, Faculté des Sciences Semlalia, B.P. 2390
40 000 Marrakech-Maroc, Phone: 212524434649, Fax: 212524437412

Abstract

The Bayoud, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa), is the most destructive disease of date palm (*Phoenix dactylifera* L) in Morocco and Algeria, with no effective control strategy yet available. In this work, two bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens* strain Ag1 (Ag) and *Burkholderia cepacia* strain Cs5 (Cs), were examined for their potential to control this disease. Both bacterial strains inhibited both growth and sporulation of Foa. They released compounds into the culture medium, which resulted into cytological changes in Foa's mycelial structure. When Jihel-date palm plantlets, a susceptible cultivar, were induced with these bacteria, the size of the necrosis zone, which reflected the spreading of the pathogen, was reduced by more than 70%, as compared with uninduced controls. To further investigate the mechanisms of such disease reduction, phenolic compounds and peroxidase activity were assessed. One month after inoculation, date palm defense reactions against Foa were different depending on the bacterium used, *Burkholderia cepacia* led to higher accumulation of constitutive caffeoyleshikimic acid isomers while *Bacillus amyloliquefaciens* triggered the induction of new phenolic compounds identified as hydroxycinnamic acid derivatives. Peroxidase activity has also been stimulated significantly and varied with the bacterial strain used and with Foa inoculation. These results add to the promising field of investigation in controlling Bayoud disease.

Keywords: Bayoud, Biocontrol, Date palm, *Fusarium oxysporum* f. sp *albedinis*, Peroxidases, Phenolics.

Abbreviation

Ag: *Bacillus amyloliquefaciens* strain Ag1

Cs: *Burkholderia cepacia* strain Cs5

Foa: *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*

JHL: Jihel

PDA: Potato-dextrose agar

PDB: Potato-dextrose broth

1. Introduction

Bayoud, a vascular disease of date palm, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* is the most damaging disease of date palm in Morocco and accounts for as much as 75% yield losses [1]. It has killed more than 10 million palm trees during the last 100 years [2]. Several control strategies such chemical treatments have been considered, but they remain inefficient and difficult to apply. The most effective measure to reduce the incidence of this disease would be to select and plant Foa-resistant cultivars. Unfortunately, strains of date palm resistant to Bayoud disease yielded low-quality fruits [2]. Recently, it was reported that Najda, a new strain of date palm plants, was resistant to Bayoud disease and produces high-quality dates [3]. However, repopulating oases with Najda cultivar could lead to a massive reduction in date palm biodiversity within a short period of time. Therefore, more integrated management strategies are needed to tackle Bayoud disease on the long term. Such strategies should combine different alternatives to accommodate quality requirements as well as environmental constraints.

Biological control methods such as those using microorganisms that can suppress plant diseases [4, 5] may be a promising disease control alternative. They are based on the screening of plant extracts or antagonistic bacteria and fungi that can confer protection against plant pathogens [6, 7]. Several biocontrol agents were identified including species of *Trichoderma*, *Penicillium*, *Gliocladium*, *Sporidesmium*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Serratia*, and many others. However, their efficacy has been often inconsistent when transferred into the field. Improving the success of such transfer relies on the elucidation of the mechanism of action and of how such mechanisms are affected by the environment. Several modes of action including antibiotic biosynthesis, parasitism, induced systemic resistance, and microbial competition were described [8]. Endogenous defense reactions were largely reported to be triggered in response to the attack by pathogens [9]. Hammerschmidt and Kuc [10] have reported that induced resistance in plants was associated with the enhancement of the cell wall lignification, the stimulation of host-defense enzymes and the synthesis of pathogenesis-related (PR) protein. In the date palm-Foa interaction, little has been reported

about the role of microbial agents in controlling bayoud disease. El Hassni et al. [7] reported that the inoculation of date palm seedlings with a hypoaggressive isolate of *F. oxysporum* provided a degree of protection against further attacks by an aggressive isolate of Foa. Jaiti et al. [11] have tested the effect of root colonization with arbuscular mycorrhizal fungi, on the induction of date palm defense reactions against its pathogen. In this study, mycorrhizal plants showed a significant accumulation of non-constitutive hydroxycinnamic acid derivatives, such as the sinapic derivative I2, known to play a crucial role in resistance of date palm to Foa [12].

Bacillus amyloliquefaciens and *Burkholderia cepacia* are known for their antifungal activity in several plant-microbe interactions. In coconut, *B. amyloliquefaciens* was found to be antagonistic against *Phytophthora palmivora*, the causal agent of bud rot disease [13]. In Arabidopsis seedlings exposed to bacterial volatile blends from *B. amyloliquefaciens*, disease severity by the bacterial pathogen *Erwinia carotovora* was significantly reduced [14]. *B. cepacia* can antagonize and repress many soilborne plant pathogens. It can prevent leaf and stem blight caused by the fungus *Alternaria* by inhibiting its spore germination. Economically important crop diseases such as blight due to *A. solani* and that caused by *A. brassicae* and *A. brassicola*, which affects the oil-producing plants rape and canola, can be controlled by *B. cepacia* [15]. Recently, Kelani-Feki and Jaoua [16] have reported that *B. cepacia* Cs5 can prevent *Botrytis cinerea* disease of vine plantlet. In addition, Kelani-Feki et al. [17] have described a broad spectrum of fungicidal activities of *B. cepacia* Cs5 against *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* and *Fusarium oxysporum*. A strain of *B. cepacia* has been developed as a successful seed and root inoculant, which can suppress the pathogenic effects of fungi on a variety of conifers [18].

The objectives of this work were to i) determine the inhibitory effect of *B. amyloliquefaciens* and *B. cepacia* on the date palm pathogen *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*, and ii) examine their potential role in triggering date palm defense reactions, including the accumulation of phenolic compounds and the activity of enzymes known for their involvement in date palm resistance such as peroxidase.

2. Results

2.1. Effects of bacterial strains on Foa growth and sporulation in vitro

The two bacterial strains showed a significant antifungal activity ($p < 0,05$) against Foa. They inhibited its growth and sporulation on PDA medium. The maximum Foa-growth inhibition was obtained after 6 days of co-culture with the bacteria; it was about 83% with Cs and 75%

with Ag. After 13 days of co-culture, this inhibition decreased to 76% and 55% for Cs and Ag, respectively, due to a re-growth of the pathogen (figure 1).

The sporulation of Foa was also inhibited in co-culture with the bacteria in liquid medium. At the 5th day of co-culture, the inhibition was about 93% and 86% with Cs and Ag, respectively. This inhibition decreased to reach 81% for Cs and 64% for Ag at the 11th day of co-culture, as the pathogen slightly re-activated its sporulation (figure 2).

The use of bacterial supernatant resulted in a zone of inhibition around it (figure 3). The extent of this inhibition zone depended on the bacterium used. The supernatant of Ag led to a larger inhibition zone (17.5 mm) than that obtained with Cs (8.9 mm), indicating their ability to release antifungal substances.

2.2. Effects of bacterial strains on Foa structure

Microscopic examinations revealed cytological alterations of Foa mycelia when cultured with any of the two bacterial strains. These alterations were different for each strain. Ag resulted in a vacuolization and an enlargement of Foa mycelium, accompanied by the expulsion of cytoplasmic contents, while Cs led to swelling of a few fragments of Foa mycelium (figure 4).

2.3. Effects of bacterial strains on the elicitation of date palm defense reactions

2.3.1. Reduction of the browning zone and development of localized necroses

The size of browning zone was markedly reduced when the roots were infiltrated with the bacteria before being inoculated with the fungal pathogen. This reduction was about 73% and 70.5% for Ag and Cs, respectively (figure 5). The browning zone often had a limited necrotic lesion (figure 6a) that normally leads to plant resistance against pathogens.

2.3.2. Enhancement of peroxidase activity

The peroxidase activity increased significantly ($p < 0.05$) in date palm roots for each of the treatments Ag, Cs, AgF, and CsF, compared to the non-inoculated and non-infiltrated control (O) (figure 7). This increase was about 88% and 113% for plants inoculated with Ag and Cs, respectively. The largest increase (180%) in the activity of this enzyme was obtained in plants inoculated with both Foa and Ag (treatment AgF). For those inoculated with Foa and Cs, this increase was about 100%.

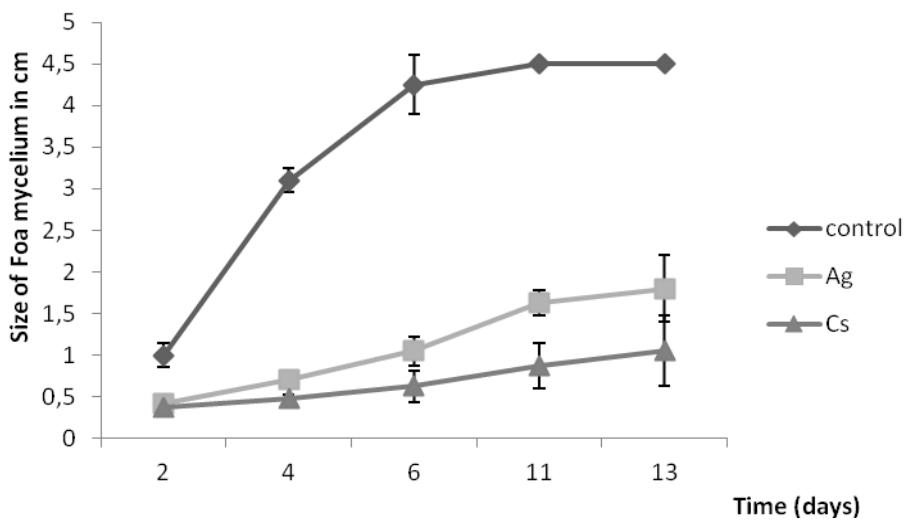


Figure 1: Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*-growth in PDA medium in co-culture with *Bacillus amyloliquefaciens* (Ag) and with *Burkholderia cepacia* (Cs).

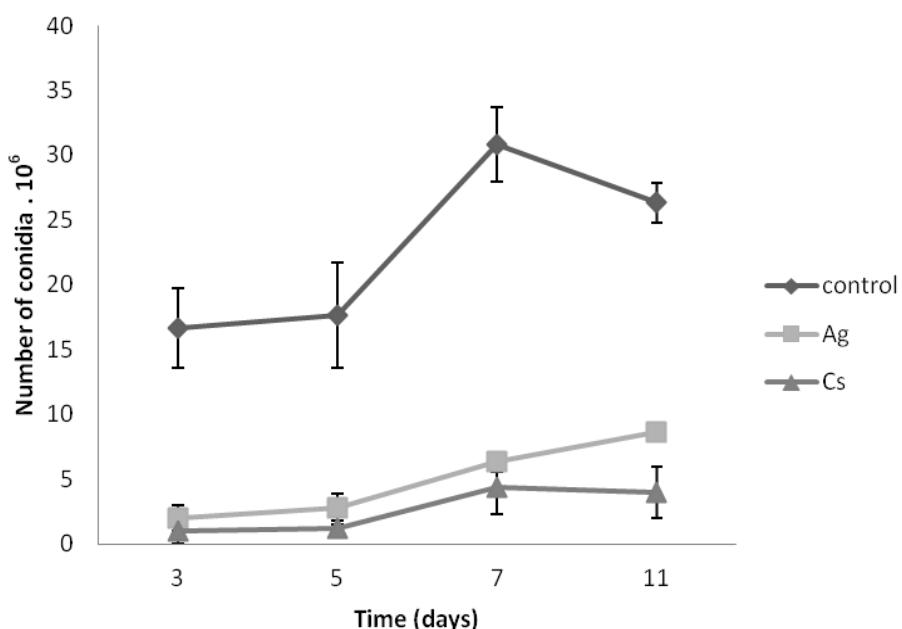


Figure 2: Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*-sporulation in PDB medium in co-culture with *Bacillus amyloliquefaciens* (Ag) and with *Burkholderia cepacia* (Cs).

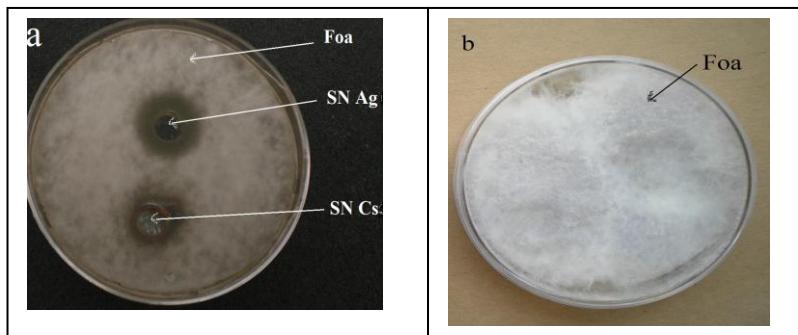


Figure 3: Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*-growth with the supernatant of *Bacillus amyloliquefaciens* (Sn Ag) and with the supernatant of *Burkholderia cepacia* (Sn Cs) (a); b: control.

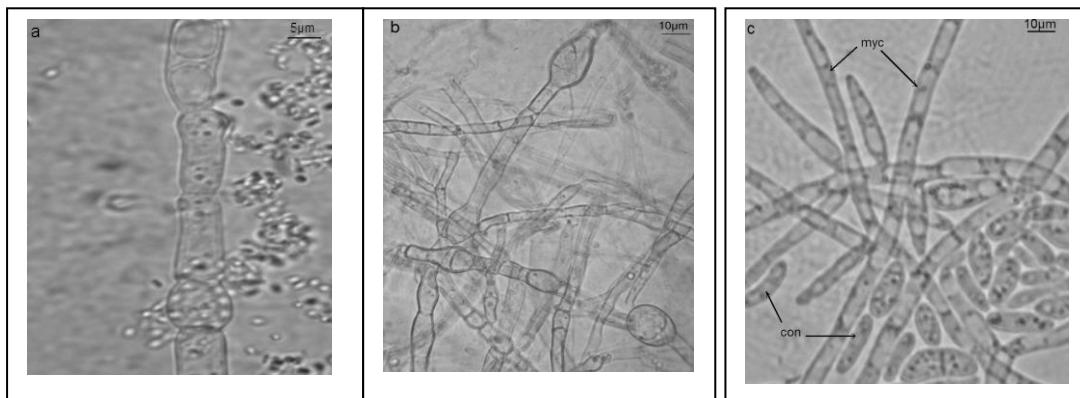


Figure 4: Cytological alterations into the *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa) mycelium, vacuolization and enlargement of Foa mycelium in co-culture with *Bacillus amyloliquefaciens* (a); cell ballooning in co-culture with *Burkholderia cepacia* (b); c: Foa in mono-culture (myc: mycelium, con: conidia).

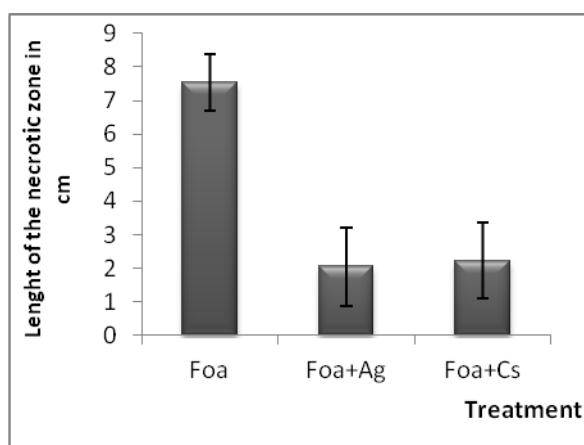


Figure 5: Size of browning zone of date palm roots inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa) alone or inoculated with Foa after being injected with the antagonists (Ag: *Bacillus amyloliquefaciens*; Cs: *Burkholderia cepacia*).

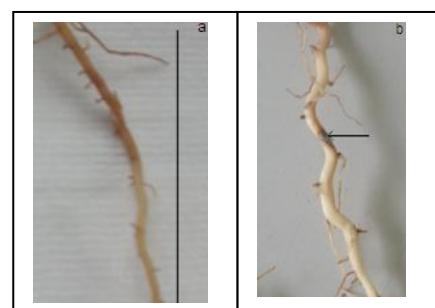


Figure 6: Browning zone of date palm roots inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa) (a); this browning zone tend to form a limited necrotic lesion when the root were infiltrated by *Bacillus amyloliquefaciens* or *Burkholderia cepacia* before being inoculated with

The SDS-PAGE analysis confirmed this result. Peroxidase activity staining revealed that some isozymes, in date palm roots infiltrated with the tested bacteria (isozymes with MM values of 140, 135 and 90 Kd) or with the bacteria and the pathogen (isozymes 46 Kd and 43 Kd), were more pronounced compared to non-inoculated roots (figure 8). In addition, there was a new isozyme of peroxidase expressed in the roots inoculated with the bacteria or with both the bacteria and the pathogen (isozyme with MM value of 50 Kd) and two other new isozymes in roots infiltrated with Ag before inoculation with Foa (40 and 38 Kd).

2.3.3. Activation of phenolic metabolism

The content of soluble phenolics has significantly increased ($p < 0.05$) in roots infiltrated with Ag and inoculated with the pathogen (treatment AgF). This increase was about 200% compared to the control and the others treatments where it was rather slight (figure 9). The examination of HPLC profiles of soluble phenolic compounds revealed the presence of constitutive caffeoylshikimic acid isomers (peaks 1, 2 and 3) in non-treated date palm roots (figure 10 a). After the inoculation by Foa, an enhancement of these isomers was observed (figure 10 b).

Interestingly, when the roots were infiltrated with Ag, the caffeoylshikimic acid isomers completely disappeared and were replaced by induced phenolic compounds (peaks 4, 5, 6 and 7) synthesized in moderate amounts and identified as hydroxycinnamic acid derivatives (figure 10c). In the case of infiltration with Ag in combination with the pathogen, the induced phenolic compounds have increased dramatically (peaks 6 and 7) while the constitutive caffeoylshikimic acid isomers were weakly present (peaks 1 and 2) (figure 10d).

For roots infiltrated with Cs, the same phenolic compounds as those induced by Ag were expressed (figure 11c). In addition, constitutive caffeoylshikimic acid isomers were present in slight amounts (peaks 1, 2 and 3). In the case of the combination Cs and the pathogen, only the constitutive caffeoylshikimic acid isomers were synthesized in larger amounts (figure 11d).

Discussion

The impact of the intensive use of chemical pesticides on the environment has resulted in the increased interest in biocontrol strategies for plant disease management.

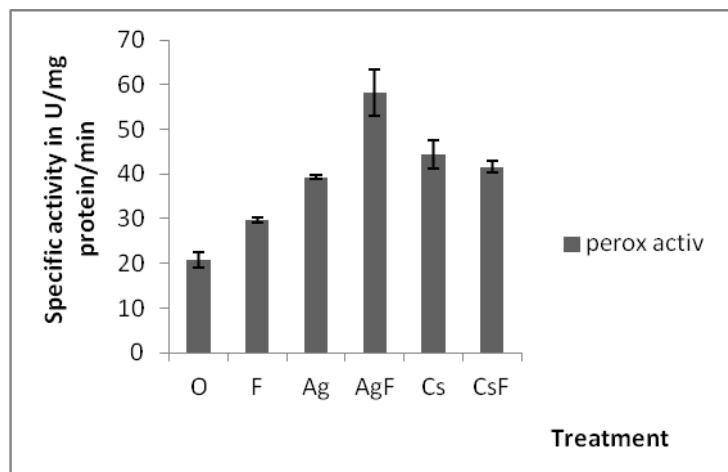


Figure 7: Specific activity of peroxidase in date palm roots treated with the bacteria and inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. O: control; Ag: roots injected with *Bacillus amyloliquefaciens*; Cs: roots injected with *Burkholderia cepacia*; F: roots injected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*.

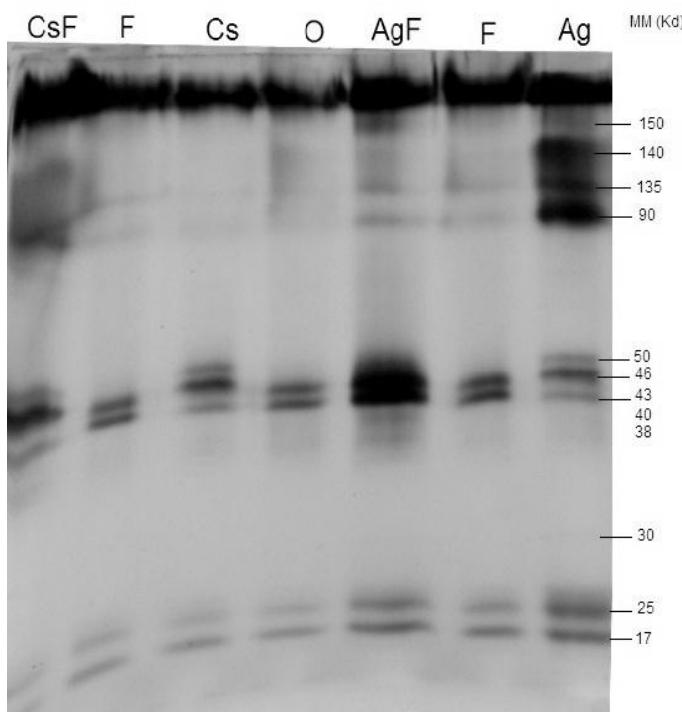


Figure 8: Active staining of peroxidase isoforms in date palm roots inoculated by the bacteria before being inoculated by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. O: control; Cs: roots injected with *Burkholderia cepacia*; Ag: roots injected with *Bacillus amyloliquefaciens*; F: roots injected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*.

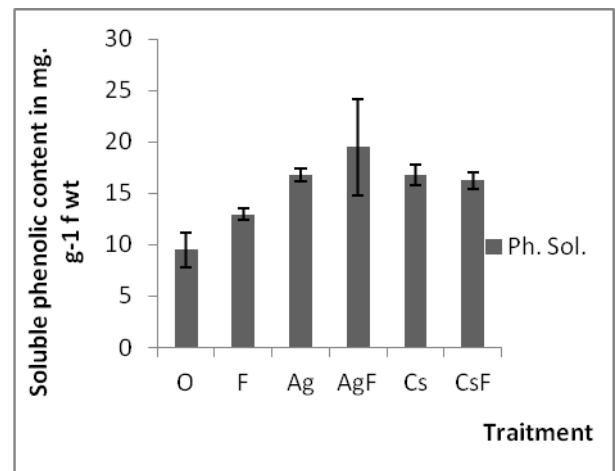


Figure 9: Soluble phenolic content of JHL-date palm roots injected by the bacteria and inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. O: control; Cs: roots injected with *Burkholderia cepacia*; Ag: roots injected with *Bacillus amyloliquefaciens*; F: roots injected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*.

In this work, we tested two bacterial strains, Ag and Cs, for their potential to control bayoud in date palm, a disease caused by Foa. The two bacterial strains exhibited a significant degree of inhibition of Foa growth and sporulation in vitro. However, Cs was more effective in inhibiting Foa development than Ag. In addition, the two bacteria released antifungal compounds into PDA medium; the metabolites released by Ag were more effective against Foa development than those released by Cs. It is well documented that the potential of *Bacillus spp.* and *Burkholderia spp.* to synthesize a wide variety of metabolites with antifungal activity is determinant of their ability to control plant diseases when applied as biological control agents [17, 19]. Kelani-Feki et al. [17] had isolated the didecyl-phthalate and the alkyl-quinone, which have antifungal activity, from the supernatant of *B. cepacia* (strain Cs5). *B. amyloliquefaciens* species have also displayed high in vitro inhibitory activity toward growth of multiple fungal plant pathogens using many antibiotics such as bacillomycin, difficidin, bacilysin, fengycin and zwittermicin A [19, 20].

The result obtained here showed that Cs was more effective than Ag in vitro assays in spite of the low efficiency of its products released in the culture medium. This suggested that Cs has other modes of action, enabling it to inhibit more efficiently the pathogen development in co-culture. Competition for iron through siderophore production has been described for the biocontrol activity of *B. cepacia* [21]. Moreover, the two bacterial strains caused various morphological changes in term of vacuolization, enlargement and swelling of Foa-mycelium. Such alterations were associated with the weakening of the mycelial cell walls and the expulsion of the cytoplasmic contents. Lytic enzymes such as chitinase, β -1,3-glucanase that have been found in the extract of several *Bacillus* and *Burkholderia* species [22], may explain the lysis of Foa cell walls in co-culture.

Priming plants with biocontrol agents can provide systemic resistance against a broad spectrum of pathogens and reduced plant diseases [14]. The induction of the defense reactions was reported to be associated with more lignification, stimulation of host-defense enzymes and synthesis of pathogenesis-related (PR) proteins [10]. In the present study, pretreatment of date palm roots with Cs or Ag significantly reduced the size of the browning zone around the Foa-inoculation site and led to localized necrosis. When the necrosis was formed, disease symptoms were reduced and the plants were more resistant to Bayoud disease. This reflected the restriction of the pathogen at the inoculation site. Such restriction was described in the roots of pea bacterized with *Bacillus pumilus* strain SE 34 and challenged with *Fusarium oxysporum f. sp. pisi* [23]. In date palm plants, the correlation between the hypersensitive-like reaction limited necrotic lesions and the disease resistance was well established [24, 25].

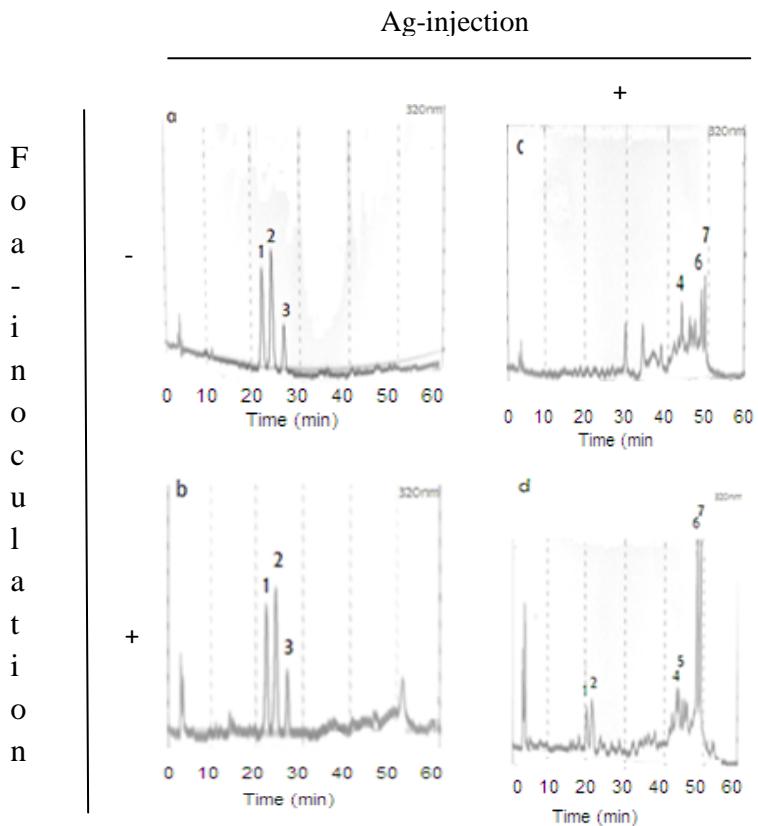


Figure 10: HPLC profils of solubles phenolic compounds of JHL-date palm roots. a: control; b: roots inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa). c: roots injected with Ag; d: roots injected with Ag and Foa (Ag: *Bacillus amyloliquefaciens*; 1, 2, 3: caffeoyleshikimic acid isomers; 4, 6, 7: hydroxicinnamic acid derivatives).

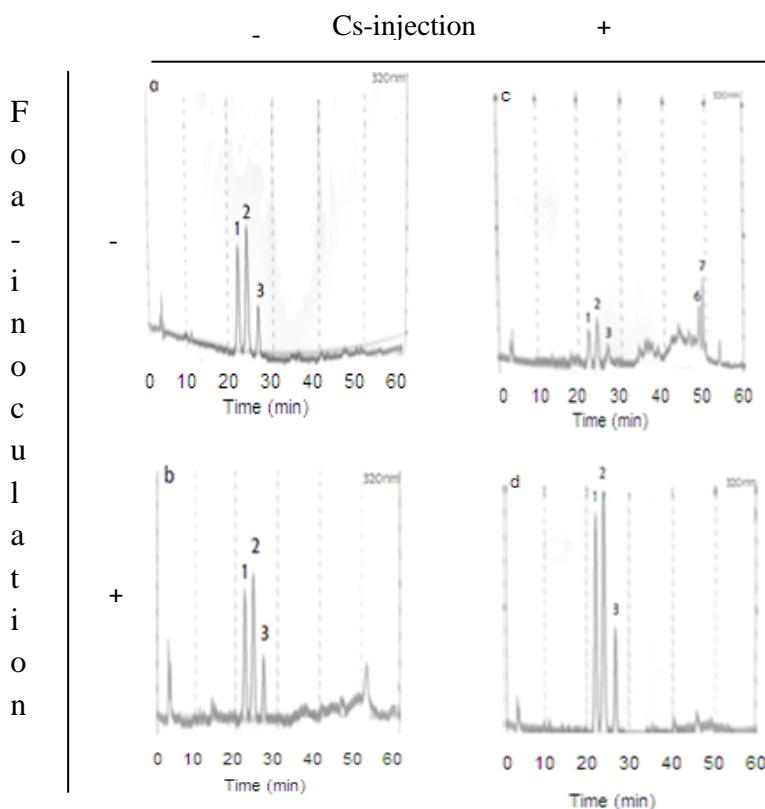


Figure 11: HPLC profils of solubles phenolic compounds of JHL-date palm roots. a: control; b: roots inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa); c: roots injected with Cs; d: roots injected with Cs and Foa (Cs: *Burkholderia cepacia*; 1, 2, 3: caffeoyleshikimic acid isomers; 4, 5, 6, 7: hydroxicinnamic acid derivatives).

Furthermore, marked increase in the activity of peroxidases and new isozymes of this enzyme were observed in roots infiltrated with each bacterium with and without challenge by the pathogen. The increase in peroxidase activity has been reported in several interactions between plants and biocontrol agents [26]. However, the induction of new isozymes of peroxidase, in correlation with the application of the two bacteria used, is to our knowledge, first reported in date palm in the present study. Similar results have been described in plants inoculated with the Tobacco necrosis virus in tomato-*Phytophthora infestans* pathosystem [27] and in cucumber colonized by plant growth-promoting rhizobacteria [28]. This corroborates other findings that correlated date palm resistance against Foa with peroxidase activity [25,29]. In addition, the results obtained revealed that Ag was more effective in enhancing peroxidase activity compared to Cs especially for roots inoculated with the bacterium before being challenged with the pathogen. This is in agreement with earlier results, in which pre-treated date palm with a hypoaggressive *Fusarium oxysporum* isolate showed more intense defense reactions after Foa challenge [7]. Peroxidases were reported to be involved in several biochemical and physiological processes, such as cell wall lignification, cross-linking of cell wall components and synthesis of phytoalexins, as well as reactive oxygen species' metabolism and the hypersensitive response (HR) [30]. This can strengthen the plant cell walls and prevent the invasion of the host tissues by pathogens [31]. This enhancement of peroxidase activity could explain the restriction of the pathogen at the necrotic zone of date palm roots inoculated with the bacteria before being challenged with Foa. Interestingly, most of the isozymes induced in date palm roots were also expressed in jasmonic acid-treated date palm plants [29]. This is in agreement with disease resistance pathways involved in induced systemic resistance.

Synthesis of phenolics is the most established defense reaction in date palm in response to Foa infection [12,32,33]. However, very little is known about their involvement in biocontrol mechanisms. El Hassni et al. [34] have selected four bacteria among twenty-one others for their inhibitory effect on both growth and sporulation of Foa, and showed that these bacteria were also able to induce the accumulation of phenolic compounds in absence of Foa inoculation.

In the work presented here, we showed the accumulation of several phenolic compounds when the roots were inoculated with different microorganisms. The inoculation of JHL-date palm roots with the pathogen slightly increased the constitutifs caffeoylshikimic acid isomers. Their infiltration with the biocontrol agents led to moderate synthesis of new phenolic compounds, characterized as hydroxicinnamic acid derivitatives, at the expense of the

caffeoylshikimic isomers. This suggested that the fungal elicitors were different than bacterial ones. The fungal elicitors led to an increase in term of constitutive caffeoylshikimic acid isomers while the bacterial ones have triggered the synthesis of the new hydroxicinnamic acid derivatives. The induced hydroxicinnamic acid derivitatives obtained here were different than the sinapic acid derivative I2 suggested as a phytoalexin in date palm [12] and induced in the roots inoculated with some selected bacteria [34]. This supports the involvement of others hydroxicinnamic acid derivitatives, whose exact chemical nature remains to be determined in date palm defense response. Daayf et al. [33] have reported the involvement of several hydroxicinnamic acid derivatives in date palm callus in relation with defense responses. In addition, induction of phenolic compounds by the two bacteria was substantially amplified upon infection with the pathogen. Similar results were reported in the pathosystem pea-*Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* subsequently to the elicitation by *Pseudomonas fluorescens* [35] and in the pathosystem tomato-*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* after treatment with *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28 [36] and were associated with plant defense responses. Arfaoui et al. [6] have reported that pre-treatment of chickpea seedling with *Rhizobium* isolates (PchDMS and Pch43) before inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* enhanced the expression of phenylpropanoid defense-related genes involved in phenolics synthesis. Furthermore, date palm response depends on the bacterium used. In the combination Ag/Foa, date palm roots have exhibited a significant increase in term of induced hydroxicinnamic acid derivatives clearly higher than what was found with the bacterium alone, whereas, in the combination Cs/Foa, the increase involved the constitutive caffeoylshikimic isomers. This result might lead to suggest the involvement of two pathways in date palm defense response leading to phenolic compounds' synthesis. The first pathway requires elicitors from Foa and leads to amplification of constitutive caffeoylshikimic isomers (peaks 1, 2 and 3, figures 10 and 11), the second pathway involves induction by the bacteria and leads to induced hydroxicinnamic acid derivatives (peaks 6 and 7, figure 10). In both cases, synthesized phenolic compounds were correlated to disease resistance since bacterial-pretreated roots have shown reduced browning zone around the inoculation site which reflected the restriction of the pathogen.

Determination of both bacterial and fungal elicitors and Characterization of the phenylpropanoid pathway involved in date palm defense against *F. oxysporum*, constitute two essential elements for future investigation focusing on the use of biocontrol strategy to protect date palm in the field. In more general terms, finding innovative measures to address the

increasingly evident capacity of fungal pathogens to counteract plant defenses [5,37,38] will also become as important component in dealing with plant diseases in the future.

3. Materials and Methods

3.1. Microorganisms and in vitro tests

The Foa was isolated from Bayoud-diseased rachis of date palm brought from Zagora in the south of Morocco [39]. The tested bacteria come from Laboratory of Biopesticides, Centre of Biotechnology of Sfax Tunisia, they were isolated from the rhizosphere of almond trees in the Sfax region.

Antagonism between bacteria and Foa was assessed by dual cultures on potato-dextrose medium. The inhibition of Foa growth was evaluated in PDA (potato-dextrose agar) medium. 10 µl of bacterial suspensions (10^{10} CFU.ml⁻¹) was placed at the center of assay plates, two 5-mm-diameter PDA plugs covered with actively growing mycelium were placed about 2 cm from both sides the bacterium colony. Fungal plugs were also placed on uninoculated assay plates as controls.

Plates were then incubated in the dark at 28 ± 2 °C, the length of hyphal growth toward the bacteria and that on a control plate were measured.

The inhibition of Foa sporulation was assessed in PDB (potato-dextrose broth) medium, 10µl of bacterial suspension (10^{10} CFU.ml⁻¹) and 10µl of Foa suspension (10^6 spores.ml⁻¹) were placed in a 250-ml flask with PDB medium and incubated in a rotary shaker at 28 ± 2 °C. The Foa sporulation was determined under microscope using a hemocytometer and the results were expressed as the number of conidia per ml.

After 7 days, morphological changes on fungal mycelia were examined under a light microscope (Motic B1). Four replicates were conducted for each fungal-bacterium isolate combination.

3.2. Effect of bacterial supernatant on Foa growth

The two bacteria were grown in (PDB) at 25°C on a rotatory shaker. Cultures (10^{10} CFU.ml⁻¹ for each bacterium) were centrifuged at 8.000 ($\times g$) for 20 min and the supernatants were collected. 50µl of fungal suspension at 10^6 spores.ml⁻¹ was spread onto the PDA medium. At the center of the plates, a 5-mm-diameter well was made and was filled with 100 µl of the bacterial supernatant. Plates were incubated at 28°C for 2 days and the extent of the inhibition zone was measured.

The experience had four replicates for fungal-supernatant combinations.

3.3. Inoculation of seedlings with the pathogen and the antagonists

Seeds of date palm cultivars susceptible to bayoud (“Jihel”, JHL) were disinfected and germinated aseptically on moistened sterile peat, in the dark, during 2 weeks at 30 °C. Then seedlings were put into pots containing a mixture of sand and peat (1/1, v/v) previously sterilized at 180°C for three hours before being transferred in a growth chamber with 25°C and 16 h photoperiod.

Bacterial suspensions (10^{10} CFU.ml $^{-1}$) were prepared in sterile distilled water, and 30 µL injected with a syringe into three mains roots of six-months seedlings (40 plants were used for each bacterium). Seedlings were then transferred into 250-ml flasks containing sterile distilled water and incubated at 25 °C in a growth chamber with 16 h photoperiod. Forty control plants were injected with sterile distilled water. After 3 days, the roots of twenty plants from each treatment (control, Ag, Cs) were inoculated with 30µl of a fungal suspension of *Foa* (10^6 spores.ml $^{-1}$). Each group was divided into four replicates (5 plants per replicate). The observations and analyses were carried out one month after inoculation.

As a result, we had 6 treatments: O, control; F, plants inoculated with *Foa*; Ag, plants infiltrated with *B. amyloliquefaciens*; AgF, plants infiltrated with *B. amyloliquefaciens* and inoculated with *Foa*; Cs, plants infiltrated with *B. cepacia*; CsF, plants infiltrated with *B. cepacia* and inoculated with *Foa*.

Disease severity was assessed by measuring the size of the necrotic zone developed around the inoculation site.

3.4. Peroxidase Assay

Protein extraction was conducted with 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) containing 4% polyvinylpyrrolidone. Root tissues (200 mg) were homogenized in 1ml of the buffer solution, and the homogenate centrifuged at 10.000 (×g) for 30 min. The supernatant was used as the enzyme extract. All steps were done at 4°C and protein content was determined by the method of Bradford [40] using bovine serum albumin as a standard. Total peroxidase activity was assessed at 470 nm using guaiacol as the hydrogen donor. The reaction mixture was composed by 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 25 mM guaiacol. The reaction was started with 20µl of H₂O₂ at 10% and stopped after 3 min. Peroxidase activity was calculated using the molar extinction for tetraguaiacol (26.6 mM $^{-1}$ cm $^{-1}$) and the specific activity was expressed as U per milligram of total proteins.

SDS-PAGE of peroxidases was carried out using acrylamide-bisacrylamide (30–0.8) gels as described by Baaziz [41]. Fifty μ l of enzyme extract were subjected to electrophoresis which was carried out at constant current of 60 mA for 2–4 h. The electrophoresis buffer was TGS (Tris-Glycine-SDS) (pH 8.1). Peroxidase activity was visualized in gels using benzedine and H_2O_2 in 0.2 M acetate buffer (pH 5). The reaction was stopped by removing the substrates and rinsing the gels with water.

3.5. Extraction and identification of soluble phenolic compounds

Levels of soluble phenolic compounds were determined according to Dihazi et al. [24]. Root tissues (200 mg), taken around the infection sites, were homogenized in an ice bath with 2 ml methanol. The homogenate was centrifuged three times at 7.000 ($\times g$) for 3 min; supernatants were collected each time. Fifty μ l of the supernatant were added to Folin-Ciocalteu reagent and sodium carbonate. The mixture was incubated at 40°C for 30 min and the blue color was read at 760 nm. The content of soluble phenolics was expressed in mg-equivalents of catechin per g of fresh weight.

Phenolic analyses were carried out using an HPLC equipment Waters 600E supplemented with a photodiode array detector Waters 990 and Millipore software for data analysis. An efficient gradient of acetonitrile-o-phosphoric acidified bidistilled water (pH 2.6) was used on a C18 reversed phase analytical column. Phenolics were identified on the basis of their retention times and their distinctive spectra in comparison with standards.

3.6. Statistical analysis

The data were analyzed with ANOVA using SPSS Statistic 17.0, the significance of differences among treatments was recorded at $p < 0.05$ by Post-hoc comparisons using Tukey HSD test.

Acknowledgements

Financial support for this work was provided by PRAD 11-05-Egide N°24172UL and AI (Tunisie-Maroc) 24/02.

References

- [1] **M. Fernandez, M. Lourd, M. Ouinten, A. Tantaoui, J.P. Geiger**, Le Bayoud du palmier dattier, une maladie qui menace la phoeniciculture, *Phytoma* 469 (1995) 36–39.
- [2] **M. Saaidi**, Comportement au champ de 32 cultivars de palmier dattier vis-à-vis du Bayoud: 25 années d'observations, *Agronomie* 12 (1992) 359-370.
- [3] **H. Boumedjout**, Morocco markets Bayoud-resistant strains of date palm, *Nature Middle East* (2010) 220, doi: 10.1038/nmiddleeast.2010.220.
- [4] **M. Chérif, N. Sadfi, N. Benhamou, A. Boudabbous, A. Boubaker, M.R. Hajlaoui, Y. Tirilly**, Ultrastructure and cytochemistry of in vitro interactions of the antagonistic bacteria *Bacillus cereus* X16 and *B. thuringiensis* 55T with *Fusarium roseum* var. *sambucinum*, *J. Plant Pathol.* 84 (2002) 83–93.
- [5] **A. El Hadrami, L.R. Adam, F. Daayf**, Biocontrol treatments confer protection against *Verticillium dahliae* infection of potato by inducing anti-microbial metabolites, *Mol. Plant-Micr. Interact.* 24 (2011) 328-335.
- [6] **A. Arfaoui, A. El Hadrami, Y. Mabrouk, B. Sifi, A. Boudabous, I. El Hadrami, F. Daayf, M Cherif**, Treatment of chickpea with Rhizobium isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, *Plant Physiol. Biochem.* 45 (2007) 470-479.
- [7] **M. El Hassni, F. J'Aiti, A. Dihazi, S. Ait Barka, F. Daayf, I. El Hadrami**, Enhancement of defense responses against Bayoud disease by treatment of date palm seedling with an hypoaggressive *Fusarium oxysporum* isolate, *J. Phytopathol.* 152 (2004) 1-8.
- [8] **S. Compant, B. Duffy, J. Nowak, C. Clément, and E. Ait Barka**, Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects, *Appl. Env. Microbiol.* 71 (2005) 4951–4959
- [9] **T. Boller, S.Y. He**, innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens, *Sci* 324 (2009) 742-744.
- [10] **R. Hammerschmidt, J. Kuc**, Induced Resistance to Disease in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordsecht, 1995, p. 182.
- [11] **F. Jaiti, A. Meddich, M. Kassami, I. El Hadrami**, Effect of Arbuscular Mycorrhization on the accumulation of hydroxycinnamic acid derivatives in date palm seedlings challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, *J. Phytopathol.* 156 (2008) 641 – 646.

- [12] **I. El Hadrami, T. Ramos, M. El Bellaj, A. El Idrissi-Tourane, J.J. Macheix**, A sinapic derivative as induced defense compound of date palm against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, the agent causing Bayoud disease, *J. Phytopathol.* 145 (1997) 329–333.
- [13] **V. Jayasuja, R. Iyer**, Multiplication and translocations of introduced endophytic antagonistic bacterium (*Bacillus amyloliquefaciens*) in coconut seedlings, 6th Intl. PGPR workshop, Calicut, India, 2003, pp. 33-37.
- [14] **C.M. Ryu, M. A. Farag, C. H. Hu, M. S. Reddy, J. W. Kloepper, P. W. Pare**, Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 134 (2004) 1017–1026.
- [15] **A. Joy, J. Parke**, Biocontrol of Alternaria leaf blight on American ginseng by *Burkholderia cepacia* AMMD, in: Bailey WG, Whitehead C, Procter JTA, Kyle JT (Eds), Challenges of the 21st century, Proceedings of the International Ginseng Conference, Vancouver, British Columbia, Canada, Burnaby, B.C., Canada, Simon Fraser Univ. 1994.
- [16] **O. Kilani-Feki and S. Jaoua**, Biological control of *Botrytis cinerea* using the antagonistic and endophytic *Burkholderia cepacia* Cs5 for vine plantlet protection, *Can. J. Microbiol.* 57 (2011) 896–901.
- [17] **O. Kelani-Feki, G. Culoli, A. Ortalo-Magné, N. Zouari, Y. Blache, S. Jaoua**, Environmental *Burkholderia cepacia* Cs5 acting by two analogous alkyl-quinolones and a didecyl-phtalate against a broad spectrum of phytopathogens fungi, *Curr Microbiol.* 62 (2011) 1490-1495.
- [18] **M. Reddy**, Status on commercial development of *Burkholderia cepacia* for biological control of fungal pathogens and growth enhancement of conifer seedlings for a global market, Washington, US Forest service general technical report PNW, Report no 389, 1997, pp. 235-44.
- [19] **S.N.P. Athukorala, W.G.D. Fernando, K.Y. Rashid**, Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry, *Can. J. Microbiol.* 55 (2009) 1021-1032.
- [20] **X. Chen, R. Scholz, M. Borriss, H. Junge, G. Mogel, S. Kunz, R. Borriss**, Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* Dare efficient in controlling fire blight disease, *J. Biotech.* 140 (2009) 38-44.
- [21] **J. M. Meyer, V. Tran, A. Stinzi, O. Berge, G. Winkelmann**, Ornibactin production and transport properties in strains of *Burkholderia cepacia* and *Burkholderia vietnamensis* (formely *Pseudomonas cepacia*), *Biometal* 8 (1995) 309-307

- [22] **N. Buensanteai, G.Y. Yuen, S. Prathuangwong**, The Biocontrol Bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 Produces Auxin, Surfactin and Extracellular Proteins for Enhanced Growth of Soybean Plant, *Thai J. Agricul. Sc.* 41 (2008) 101-116.
- [23] **N. Benhamou, J.W. Kloepffer, A. Quadt-Hallman, S. Tuzun**, Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria, *Plant Physiol.* 112 (1996a) 919–929.
- [24] **A. Dihazi, F. Jaiti, J. Zouine, M. El Hassni, I. El Hadrami**, Effect of salicylic acid on phenolic compounds related to date palm resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, *Phytopathol. Mediterr.* 42 (2003) 9-16.
- [25] **A. Dihazi, M.A. Serghini, F. Jaiti, F. Daayf, A. Driouich, H. Dihazi, I. El Hadrami**, Structural and biochemical changes in Salicylic acid-treated date palm roots challenged with *Fusariumoxysporum* f. sp. *albedinis*, *Journal of pathogens*, vol. (2011). Article ID 280481, 9 pages, 2011. Doi: 10.4061/2011/280481.
- [26] **C. Umamaheswari, A. Sankaralingam, P. Nallathambi**, induced systemic resistance in watermelon by biocontrol agents against *Alternaria alternate*, *Archives Phytopathol. Pl. Prot.* 42 (2009) 1187–1195.
- [27] **G. Anfoka, H. Buchenauer**, Systemic acquired resistance in tomato against *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with tobacco necrosis virus, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50 (1997) 85–102.
- [28] **C. Chen, R.R. Belanger, N. Benhamou, T.C. Paulitz**, Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth promoting rhizobacteria, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 56 (2000) 13–23.
- [29] **F. Jaiti, J.L. Verdeil, I. El Hadrami**, Effect of jasmonic acid on the induction of polyphenoloxidase and peroxidase activities in relation to date palm resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 74 (2009) 84-90.
- [30] **L. Almagro, L.V. Gómez Ros, S. Belchi-Navarro, R. Bru, A. Ros Barcelo, M.A. Pedrenô**, Class III peroxidases in plant defence reactions, *J. Exp. Bot.* 60 (2009) 377-390.
- [31] **F. Pomar, M. Novo, M.A. Bernal, F. Merino, A. RosBarcelo**, Changes in stem lignins (monomer composition and crosslinking) and peroxidase are related with the maintenance of leaf photosynthetic integrity during *Verticillium* wilt in *Capsicum annuum*, *New Phytologist*, 163 (2004) 111–123.
- [32] **C. El Modafar**, Mechanisms of date palm resistance to Bayoud disease: Current state of knowledge and research prospects, *Physiol. Mol. Pl. Pathol.* 74 (2010) 287-294.

- [33] **F. Daayf, M. ElBellaj, M. El Hassni, F. Jaiti, I. El Hadrami**, Elicitation of soluble phenolics in date palm (*Phoenix dactylifera*) callus by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* culture medium, Env. Exp. Bot. 49 (2003) 41-47.
- [34] **M. El Hassni, A. El Hadrami, F. Daayf, M. Cherif, E. A. Barka, I. El Hadrami**, Biological control of Bayoud disease in date palm: Selection of microorganisms inhibiting the causal agent and inducing defense reactions, Env. Exp. Bot. 59 (2007) 224-234.
- [35] **N. Benhamou, R.R. Bélanger, T.C. Paulitz**, 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*, Phytopathol. 86 (1996b) 1174-1185.
- [36] **P. M'Piga, R.R. Belanger, T.C. Paulitz, N. Benhamou**, Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28, Physiol. Mol. Plant. Pathol. 50 (1997) 301–320.
- [37] **M. El Oirdi, T. Abd El Rahman, L. Rigano, A. El Hadrami, M.C. Rodriguez, F. Daayf, A. Vojnov, K. Bouarab**, Botrytis cinerea Manipulates the antagonistic effects between immune pathways to Promote disease development in tomato, Plant Cell 23 (2011) 2405-2421.
- [38] **X. Wang, A. El Hadrami, L.R. Adam, F. Daayf**, Differential activation and suppression of potato defence responses by Phytophthora infestans isolates representing US-1 and US-8 genotypes, Plant Pathol. 57 (2008) 1026-1037.
- [39] **A. El Idrissi-Tourane, A. Oihabi, I. El Hadrami**, Effet des polyamines et des inhibiteurs de leur biosynthèse sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal du bayoud, Rev.Rés. Amélio. Prod. Agr. en Milieu Aride 7 (1995) 241-247.
- [40] **M.M. Bradford**, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, An. Biochem 72 (1976) 248-254.
- [41] **M. Baaziz**, The activity and preliminary characterization of peroxidase in leaves of cultivars of date palm, *Phoenix dactylifera* L, New Phytol 111 (1989) 403-411.

Partie I

Implication de certaines molécules pariétales des cellules végétales dans l'interaction palmier dattier-*Fusarium*

La paroi végétale constitue une barrière physique à la pénétration de nombreux agresseurs. Elle est majoritairement constituée de polysaccharides (cellulose, hémicellulose et composés pectiques), de glycoprotéines et de protéoglycannes. Ces molécules jouent un rôle majeur dans la croissance et la morphogenèse cellulaire mais aussi dans la réponse de la cellule végétale aux attaques parasitaires. Certains pathogènes parviennent à contourner cette barrière en développant différentes stratégies, la plus générale est la production d'enzymes hydrolytiques dégradant la paroi végétale (Walton, 1994; Idnurm et Howlett, 2001). Les réactions de défense des plantes comprennent un ensemble de mécanismes visant modifier et renforcer la paroi végétale afin qu'elle puisse échapper à la dégradation enzymatique générée par l'agent pathogène.

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à caractériser certains constituants de la paroi végétale des cellules racinaires du palmier dattier (cultivar JHL) et à étudier leur rôle dans l'interaction palmier dattier-*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Pour cela, nous avons eu recours à des colorations spécifiques par le calcofluore, la calcéine et le rouge de ruthénium ainsi qu'à la technique d'immunohistochimie. Cette dernière technique est basée sur le concept de reconnaissance entre un antigène et un anticorps spécifique. Nous avons utilisé les anticorps monoclonaux LM 1, LM 8, LM 15, JIM 13 et CCRM7, qui reconnaissent de manière spécifique certains constituants pariétaux des cellules végétales. La révélation de la réaction anticorps-antigène est assurée, sous microscope à fluorescence, par des anticorps secondaires couplés à la fluorescéine et susceptibles de reconnaître les anticorps primaires engagés dans la réaction anticorps-antigène.

L'étude a concerné deux types de structures

- les cellules de la pointe racinaire du palmier dattier (cellules bordantes) ;
- les tissus racinaires des coupes fines des racines du palmier dattier.

1. Observation et caractérisation des « cellules bordantes » des racines du palmier dattier

Les cellules bordantes sont définies comme des cellules attachées à la pointe des racines et tout autour de la coiffe racinaire et sont susceptibles de se décoller facilement de celles-ci par simple secousse de la pointe racinaire dans une goutte d'eau.

La région apicale des racines végétales a souvent montré une résistance plus forte vis-à-vis des attaques parasites que les autres parties de la plante. Le mécanisme d'une telle résistance n'est pas bien connu, cependant, il se trouve que cette résistance est étroitement corrélée avec la présence des cellules bordantes au niveau de cette région apicale. De nombreuses études ont rapporté que les cellules bordantes pourraient jouer un rôle dans les interactions plantes-microorganismes (Hawes et al., 2000 ; Vicré et al., 2005).

Dans les travaux réalisés, l'observation des « cellules bordantes » a été faite après 3 semaines de germination, dans la vermiculite humide, des graines de la variété Jihel (JHL) hautement sensible à la maladie du Bayoud. Nous avons pu distinguer deux types de cellules bordantes au niveau de l'apex racinaire, elles diffèrent par leur forme et leur taille (figures 1a et 1b). Le premier type est constitué de cellules arrondies et de petite taille, elles sont localisées au niveau de la pointe racinaire; le deuxième type de cellules est constitué de cellules allongées et plus grandes, elles sont situées sur les parties latérales de la coiffe.

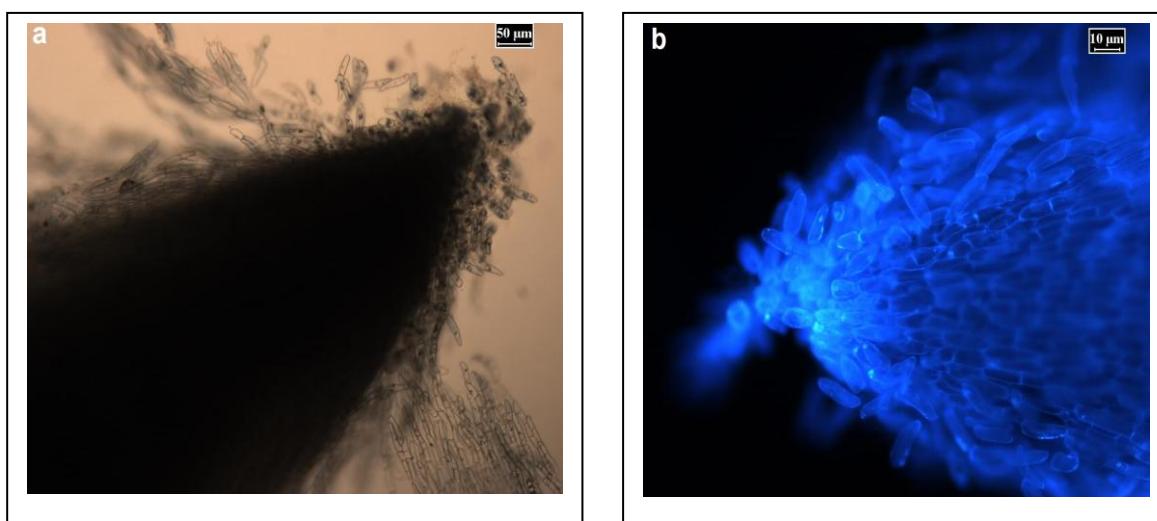


Figure 1 : Cellules bordantes de la pointe racinaire du cultivar JHL, a : sous lumière normale ; b : après coloration au calcofluore et sous microscope à épifluorescence.

La coloration des cellules bordantes par la calcéine spécifique des cellules vivantes, a permis de confirmer que ces cellules restent vivantes même après leur détachement de la pointe racinaire du palmier dattier (figure 2a). Ce qui fait de ces cellules un matériel de choix pour la compréhension de certaines composantes de l'interaction palmier dattier-Foa.

Le rouge de ruthénium, par la coloration rouge qui l'a engendré au niveau des parois des cellules bordantes, a permis de mettre en évidence la présence des pectines acides au niveau des parois de ces cellules (figure 2b).

Quant au calcofluore, qui lui est spécifique des beta-glucanes, il nous a permis, d'une part, de visualiser les cellules bordantes attachées à la pointe des racines du palmier dattier, et d'autre part, de mettre en évidence la présence de la cellulose dans les parois de ces cellules (figures 1b et 2c).

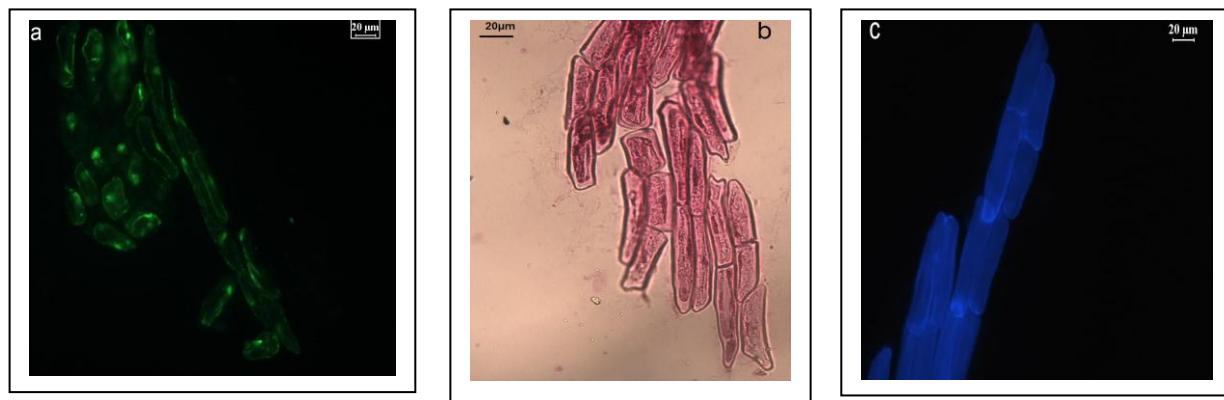


Figure 2 : Cellules bordantes de la pointe racinaire du palmier dattier. a : coloration à la calcéine, b: coloration au ruthénium, c: coloration au calcofluore; a et c sont observées au microscope à épifluorescence

2. Caractérisation de quelques molécules pariétales des cellules bordantes des racines du palmier dattier par immunohistochimie et leur implication dans l'interaction palmier dattier-Foa.

Ce paragraphe se propose d'examiner la paroi des cellules bordantes du palmier dattier en présence de l'extrait fusarique du Foa. Pour cela, des graines du palmier dattier du cultivar JHL, ont été mises en germination dans la vermiculite, puis arrosées de manière régulière par l'extrait fusarique du Foa, obtenu après culture dans le milieu PDB et filtration de la

suspension fongique (10^6 conidies /ml) à travers un filtre millipore de $0,45\mu\text{m}$ de diamètre. La caractérisation des constituants pariétaux a été réalisée à l'aide des anticorps monoclonaux spécifiques.

L'utilisation des anticorps LM 8 et LM 15, spécifiques du xylogalacturonane et du xyloglucane respectivement (figure 3), a révélé que la paroi primaire des cellules bordantes des racines du palmier dattier est constituée, en plus des β -glucanes, de xyloglucane (constituant de l'hémicellulose) et de xylogalacturonane (polysaccharide pectique). Par contre, les anticorps LM 1 et JIM 13, spécifiques des extensines et des arabinogalactanes protéines (AGPS) respectivement, n'ont pas engendré de marquage significatif au niveau des parois des cellules bordantes, dans nos conditions d'expérimentation.

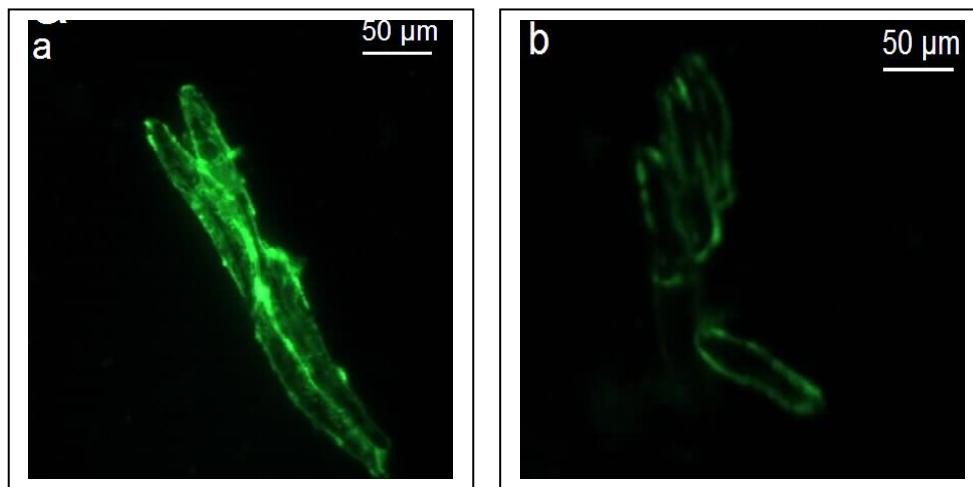


Figure 3 : Révélation des molécules pariétales par immunohistochimie au niveau des « cellules bordantes » du palmier dattier. a: marquage par l'anticorps LM 15 (spécifique des xyloglucane), b: marquage par l'anticorps LM 8 (spécifique des xylogalacturonane).

Lorsque les racines sont mises en présence de l'extrait fusarique (10ml), nous avons noté que la fluorescence associée à l'utilisation de l'anticorps LM 8 spécifique du xylogalacturonane disparaît à partir du 5^{ème} jour ce qui traduit la disparition des xylogalacturonanes (figure 4 b). Puis à partir du 10^{ème} jour, le marquage associé à l'anticorps LM 15 spécifique du xyloglucane disparaît à son tour (figure 5 b) indiquant la disparition des xyloglucanes. Ce résultat permet de mettre en évidence la présence, dans l'extrait fusarique, d'enzymes hydrolytiques capables de dégrader la paroi des cellules bordantes des racines du palmier dattier en hydrolysant ses constituants pectiques et hémicellulosiques. D'après les résultats obtenus, la dégradation des pectines (xylogalacturonane) survient bien avant celle de l'hémicellulose (xyloglucane).

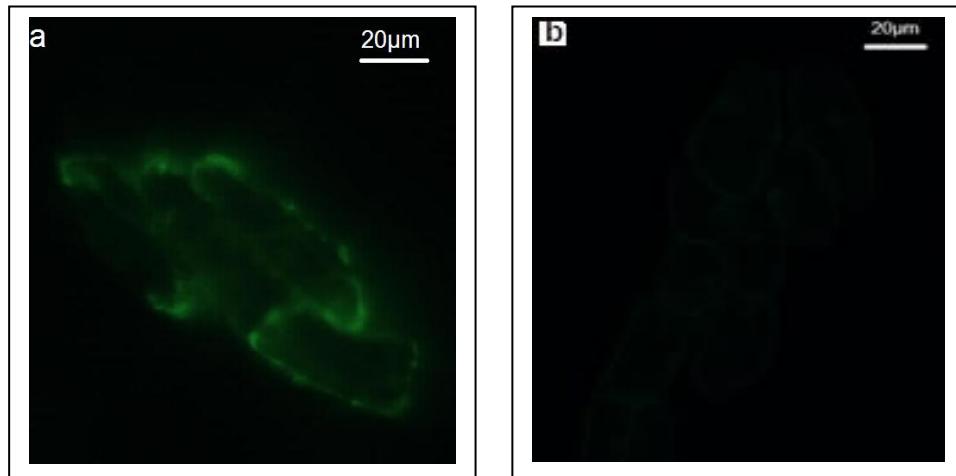


Figure 4 : Immunohistolocalisation du xylogalacturonane au niveau des cellules bordantes par l'anticorps LM8 sans aucun traitement (a) et après 5 jours de traitement par l'extrait fusarique (b).

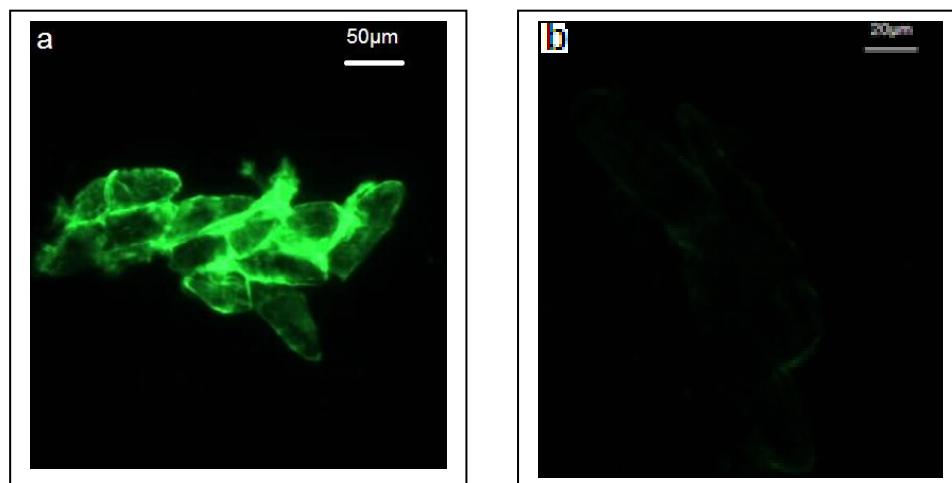


Figure 5 : Immunohistolocalisation du xyloglucane au niveau des cellules bordantes du palmier dattier marquées par l'anticorps LM 15 sans aucun traitement (a) et après 10 jours de traitement par l'extrait fusarique (b).

3. Intervention des molécules pariétales des tissus racinaires de jeunes plantes du palmier dattier dans la défense contre le Foa

3.1. Caractérisation de quelques molécules pariétales des tissus racinaires du palmier dattier par immunohistochimie

Seules les coupes traitées par les anticorps monoclonaux LM 15 spécifiques des xyloglucanes ont montré une fluorescence significative. La fluorescence a été localisée au niveau du rhizoderme et atteste de la richesse des parois de ces cellules en xyloglucanes.

Les anticorps LM8, LM1 et CCRM7 spécifiques respectivement de xylogalacturonane, des extensines et des arabinogalactanes protéines (AGPS), n'ont pas donné de fluorescence (figure 6) dans nos conditions d'expérimentation.

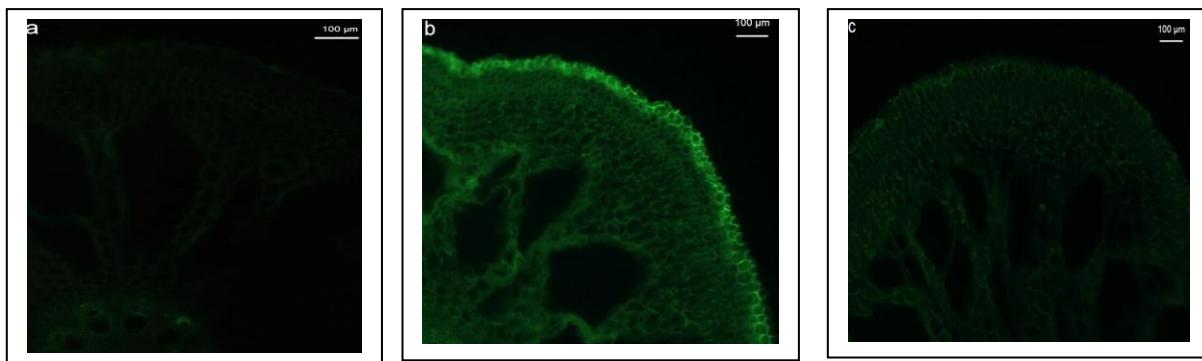


Figure 6: Révélation de quelques molécules pariétales au niveau des racines du palmier dattier par immunohistochimie ; a : marquage par l'anticorps LM 8, b : marquage par l'anticorps LM 15, c : marquage par l'anticorps CCRM7.

3.2. Implication des molécules pariétales dans la défense du palmier dattier contre le Foa

Dans cette partie, les racines des plantules du palmier dattier de trois mois (variété JHL) sont injectées par une suspension fongique du Foa (10^6 conidies /ml) à 2 cm du collet. Après incubation, des coupes sont réalisées près de la zone d'inoculation, à différents temps, et sont préparées pour les tests d'immunohistochimie afin de déterminer le devenir de certains constituants pariétaux en présence du Foa.

Les résultats préliminaires ont montré que les xyloglucanes des parois des cellules du rhizoderme disparaissent complètement après 10 jours d'inoculation des racines par le Foa (figure 7). Ce résultat confirme l'activité hydrolytique du pathogène mise en évidence dans l'extrait fusarique et ayant engendré la dégradation du xyloglucane au niveau des parois des cellules bordantes.

Concernant l'anticorps monoclonal LM 8 spécifique des épitopes associés au xylogalacturonane, le marquage reste léger et s'exprime au niveau du rhizoderme et du collenchyme tout autour du parenchyme cortical entièrement digéré par les enzymes hydrolytiques de l'agent pathogène (figure 8).

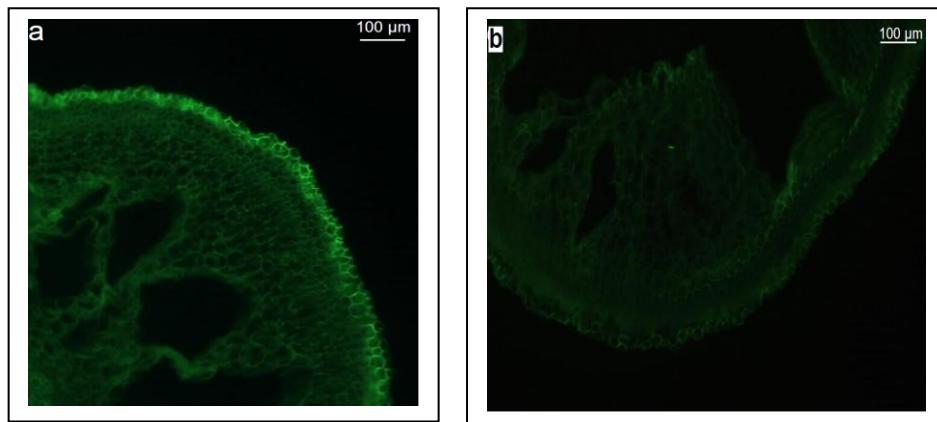


Figure 7 : Immunohistolocalisation des Xyloglucanes au niveau des racines du palmier dattier (variété JHL) par l'anticorps LM 15 avant (a) et après infection (b) par Foa.

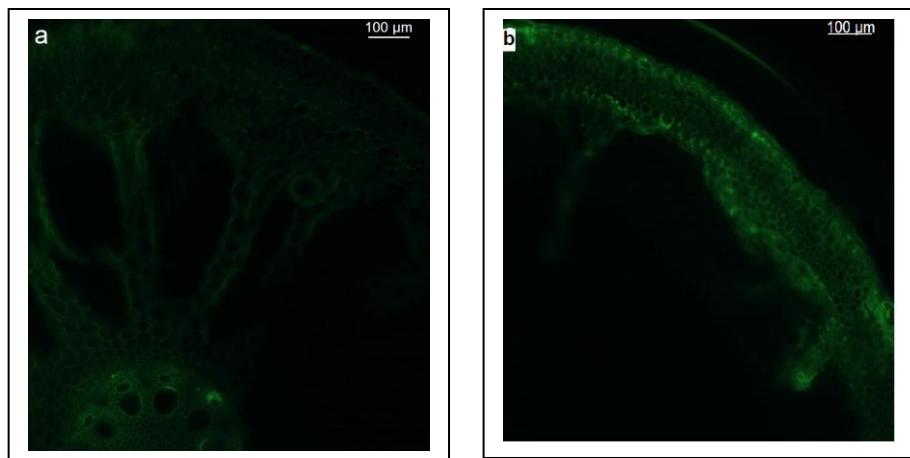


Figure 8: Immunohistolocalisation des Xylogalacturonanes au niveau des racines du palmier dattier (variété JHL) (marquage par l'anticorps LM8) avant (a) et après (b) infection par Foa.

En outre, nous avons aussi pu mettre en évidence l'expression, de manière modérée, des Arabinogalactanes protéines (AGPS) au niveau des couches périphériques des racines du palmier dattier lorsque ces dernières sont inoculées par le Foa (figure 9). Les AGPS sont

exprimées surtout par les cellules situées près des zones ayant développé une nécrose localisée.

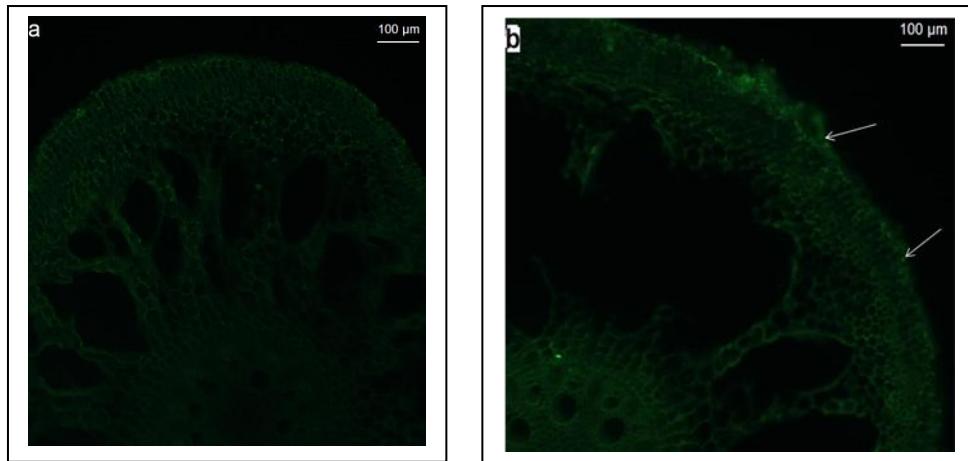


Figure 9: Immunohistolocalisation des arabinogalactanes protéines (AGPS) au niveau des racines du palmier dattier (variété JHL) (marquage par l'anticorps CCRM7) avant (a) et après infection (b) par Foa.

Par ailleurs, nous avons pu montrer, utilisant la WGA (wheat germ agglutinin), qui marque spécifiquement la chitine des parois fongiques, que la formation de la nécrose localisée est positivement corrélée avec le confinement du pathogène et l'absence des symptômes de la maladie du Bayoud (figure 10b). Par contre, dans les zones ramollies des racines présentant les symptômes de la maladie, le champignon colonise tout le parenchyme cortical engendrant sa destruction et sa résorption complète (figure 10a et a').

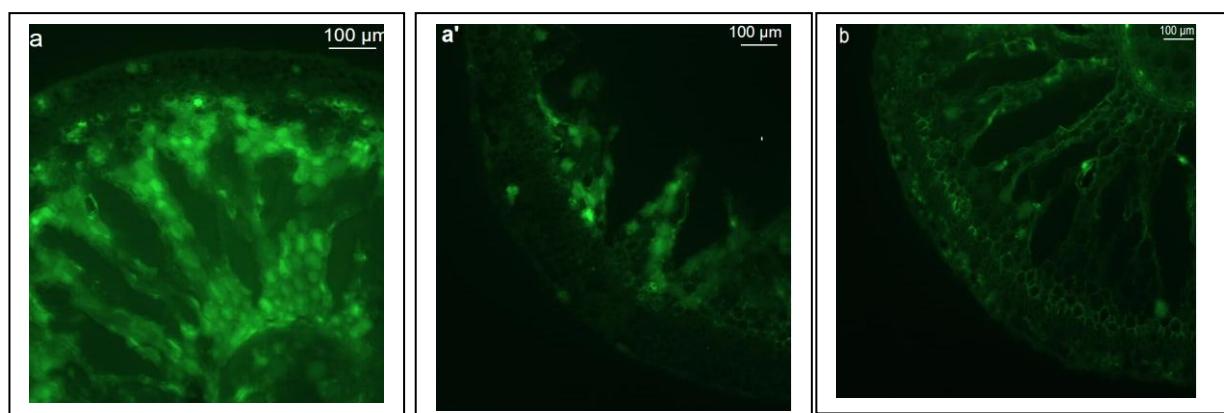


Figure 10: Révélation du Foa au niveau des racines du palmier dattier avec la WGA (wheat germ agglutinin) couplée à la fluorescéine, en absence de nécrose localisée (a et a') et au niveau de la zone nécrosée (b)

Partie II

Sélection de microorganismes antagonistes du Foa à partir du grignon en cours de compostage en vue de leur utilisation dans le contrôle biologique de la maladie de Bayoud

Cette deuxième partie s'intègre dans le cadre de la recherche de microorganismes antagonistes du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa) en vue de leur utilisation dans le contrôle biologique de la maladie du Bayoud. Elle fait suite à des travaux dans lesquels nous avons testé la possibilité de contrôler la maladie du Bayoud par des souches hypoagressives du Foa (El Hassni et al., 2004) ou par des endomychorizes (Jaiti et al., 2008). L'idée était de faire pousser des plantules de palmier dattier dans le compost de grignon, très riches en microorganismes, puis de les arroser avec une suspension fongique de Foa. Ces plantules n'ont pas présenté les symptômes de la maladie du Bayoud pendant toute la période de l'expérimentation (1 an), ce qui nous a amené à chercher l'origine d'une telle résistance parmi les microorganismes du compost de grignon. Nous avons sélectionné un certain nombre de champignons et de bactéries qu'on a mis, séparément, en co-culture avec le Foa tout en examinant le degré d'inhibition du développement de ce dernier.

Deux champignons, Ch1 et Ch2, et une bactérie, Cp2Co5, ont été sélectionnés pour leur pouvoir inhibiteur significatif de la croissance et de la sporulation du Foa.

En milieu PDA (potato dextrose agar), les deux champignons ont montré un pouvoir inhibiteur significatif de la croissance du Foa (60% et 76% pour Ch1 et Ch2 respectivement) (figure 1 et 2). En milieu PDB (potato dextrose broth), nous avons noté une inhibition importante de la sporulation du Foa (97% et 89% pour Ch1 et Ch2 respectivement) (figure 3).

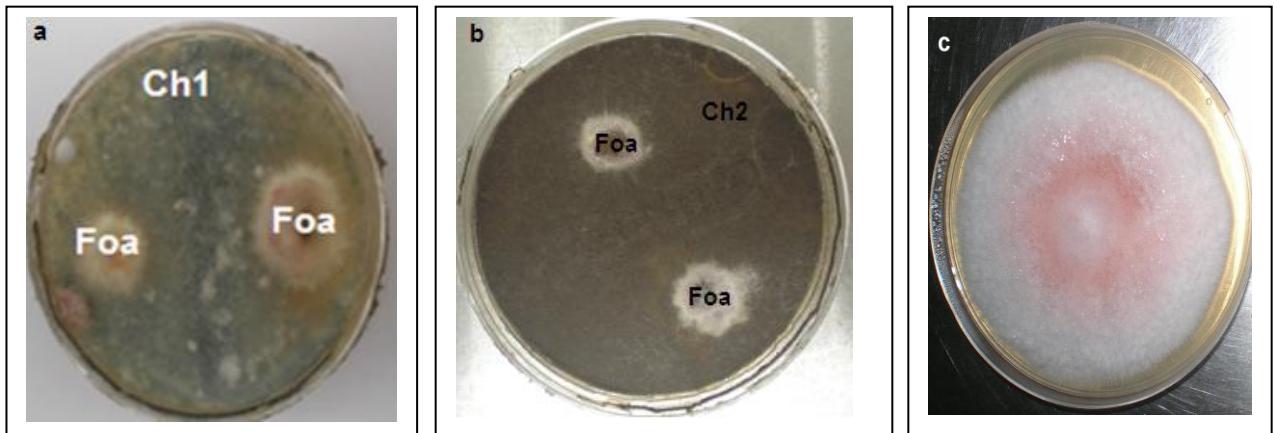


Figure 1: Co-culture du Foa avec les champignons du compost de grignon, après une semaine d'incubation à 30°C, en milieu PDA. a : co-culture du Foa avec le champignon Ch1 ; b : co-culture du Foa avec le champignon Ch2 ; c : culture du Foa seul (Foa: *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, Ch: champignon)

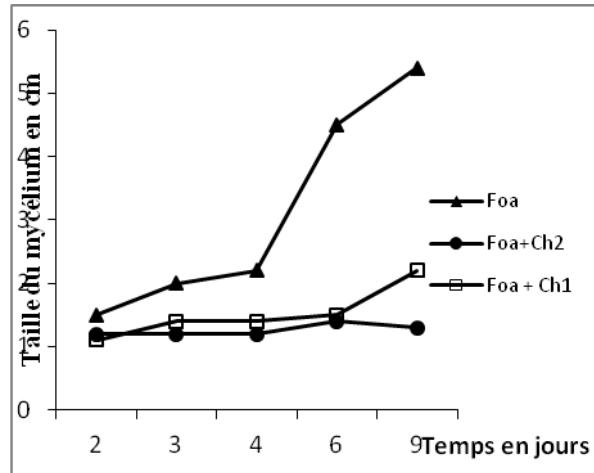


Figure 2 : Inhibition de la croissance du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa) par les champignons du compost de grignon (Ch1 et Ch2)

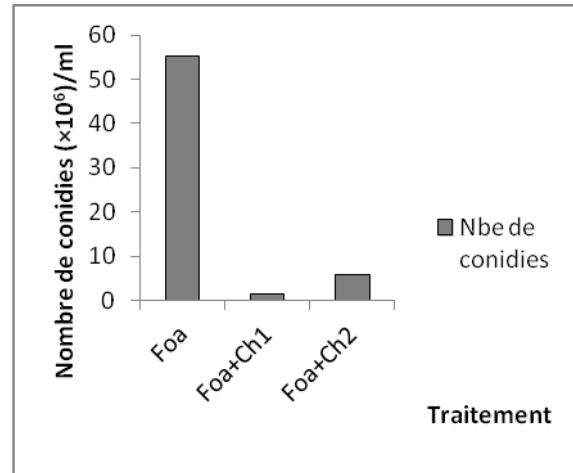


Figure 3 : Inhibition de la sporulation du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa) par les champignons du compost de grignon (Ch1 et Ch2) après une semaine de co-culture

Une première caractérisation des deux champignons à base de leurs sporocystes laisse penser que :

Ch1 appartient au genre *Penicillium* (figure 4)

Ch2 appartient au genre *Aspergillus* (figure 5)

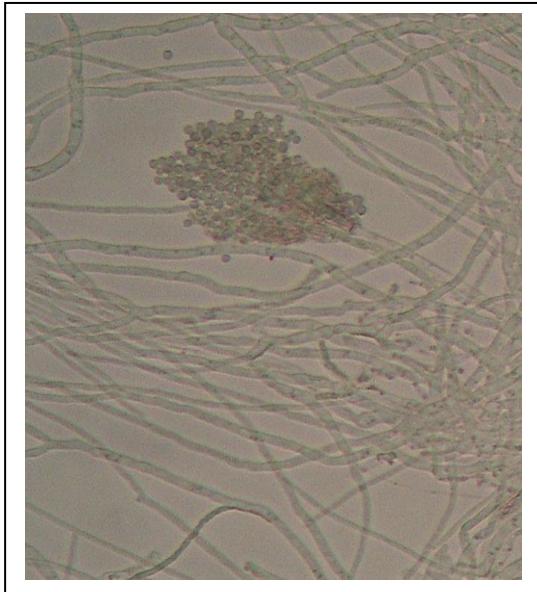


Figure 4 : Sporocystes du champignon Ch1 monté dans une goutte d'eau et observés sous microscope optique ($\times 400$)



Figure 5 : Sporocystes du champignon Ch2 monté dans une goutte d'eau et observés sous microscope optique ($\times 400$)

Un intérêt particulier a été accordé à la bactérie Cp2Co5 qui a montré une inhibition qui peut atteindre 85% aussi bien pour la croissance que pour la sporulation du Foa (figures 6, 7 et 8). Cet intérêt est justifié par les altérations morphologiques engendrées par cette bactérie au niveau du mycélium du Foa. Celles-ci sont mises en évidence sous microscope optique, elles sont caractérisées par le gonflement des fragments mycéliens et la formation de nombreuses vésicules qui remplissent le cytoplasme (figure 9). Des gonflements similaires ont été notés au niveau du mycélium du Foa incubé à 60°C (figure 10). Ces altérations sont parfois accompagnées par l'éclatement de la paroi fongique et la libération du contenu cytoplasmique vésiculaire (figure 9). Ces résultats sont confirmés par l'observation du Foa, issu d'une co-culture avec Cp2Co5, sous microscope électronique à balayage où la paroi du mycélium du Foa est déchirée et ses vésicules sont libérées (figure 9d).

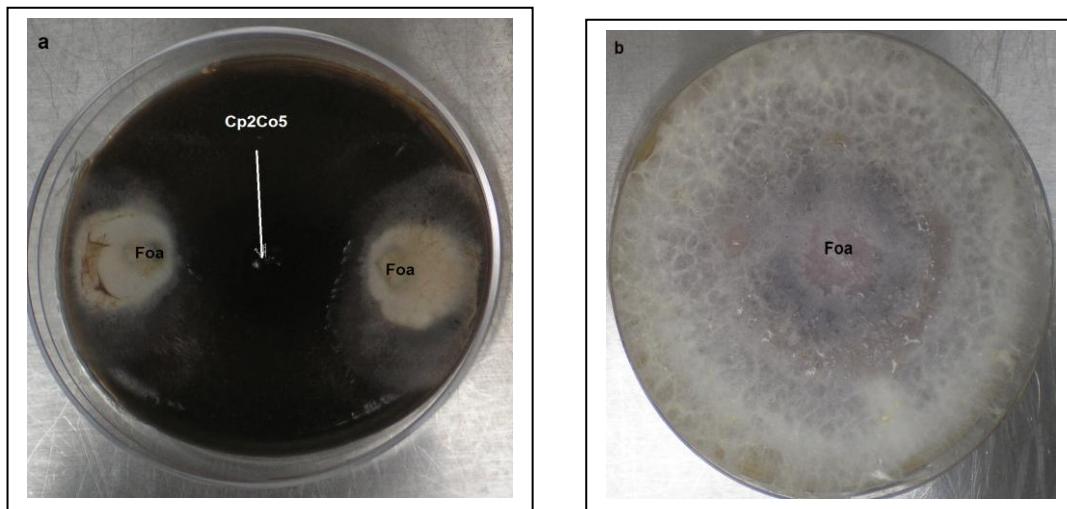


Figure 6 : Co-culture de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa) et de Cp2Co5, après 15 jours d'incubation à 30°C, en milieu PDA (a) ; b : Foa en monoculture.

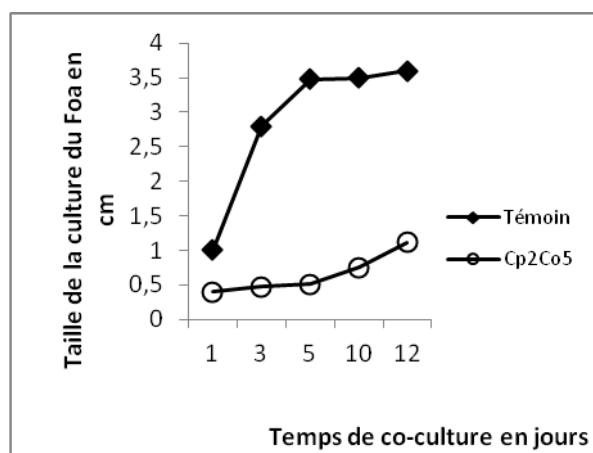


Figure 7 : Inhibition de la croissance du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa) par la bactérie Cp2Co5.

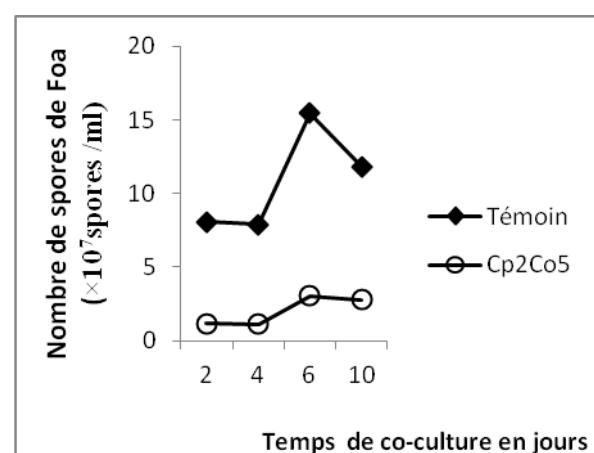


Figure 8: Inhibition de la sporulation du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa) par la bactérie Cp2Co5.

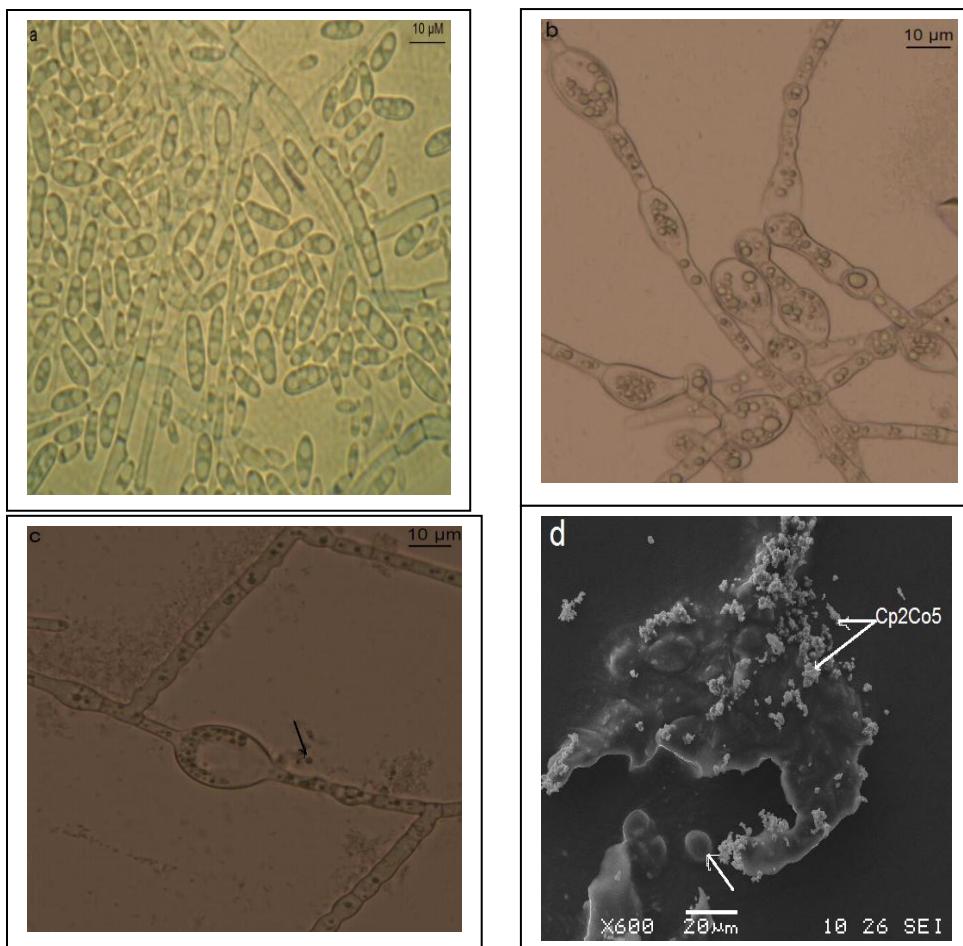


Figure 9: Interaction *in vitro* entre la bactérie Cp2Co5 et *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa); a : Foa en monoculture, b, c, Foa en co-culture avec Cp2Co5. b : gonflement du Foa et formation de vésicules cytoplasmiques, c : éclatement des fragments gonflés et libération des vésicules cytoplasmiques (flèche), d : un fragment du Foa observé au microscope électronique à balayage montrant une déchirure de la paroi fongique et la libération des vésicules cytoplasmiques (flèche).

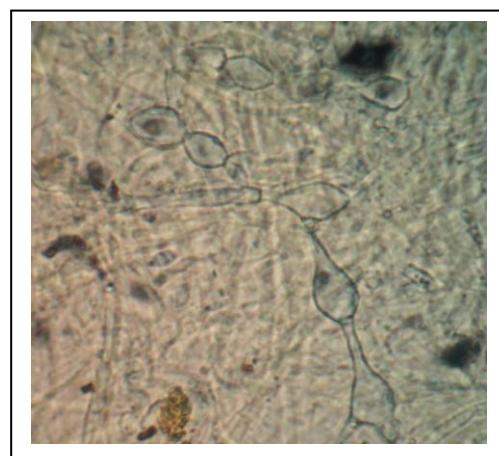


Figure 10 : *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* incubé à 60°C en milieu PDA

Ces observations suggèrent que cette bactérie induit une fragilisation de la paroi du champignon, une désorganisation de son contenu cellulaire (formation de vésicules cytosolique) et une lyse de sa membrane cytoplasmique.

La coloration par le bleu de trypan, colorant spécifique des parties mortes des champignons, révèle que l'addition de la bactérie Cp2Co5 à des cultures en milieu liquide d'une semaine de Foa, entraîne la mort d'une grande partie du mycélium et des spores (figure 11a). De plus, les spores en germination présentent des tubes germinaux possédant des parois grêles et altérées (figure 11b).

La bactérie Cp2Co5 a été identifiée, par séquençage de l'ADN ribosomial 16 S, au Laboratoire de Microbiologie, Signaux et MicroEnvironnement de l'Université de Rouen comme une *Pseudomonas aeruginosa*

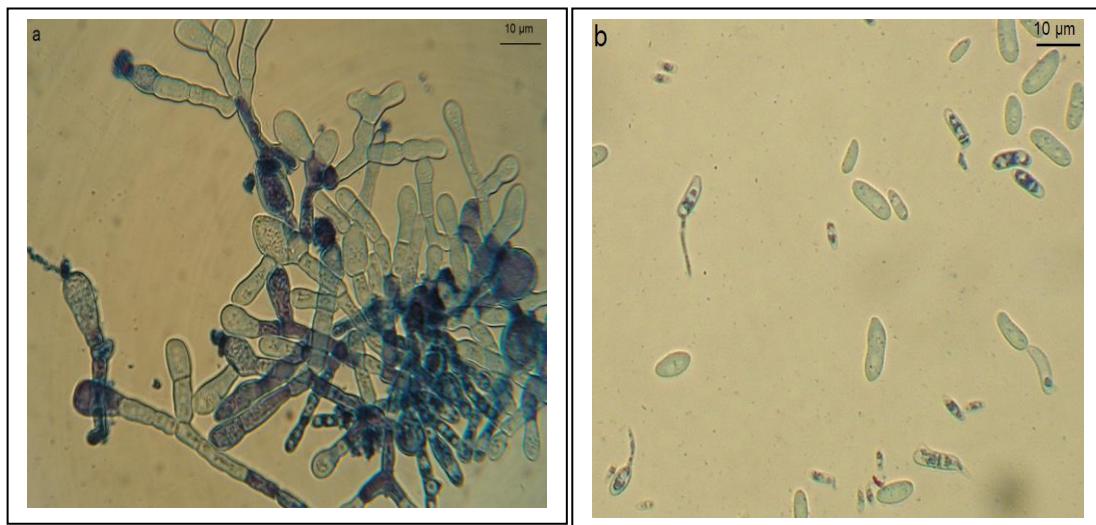


Figure 11: Co-culture du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa) avec la bactérie Cp2Co5. Observation microscopique après coloration par le bleu de trypan. a : lyse de la paroi du mycélium du Foa et libération de son contenu cytosolique ; b : conidies en germination, noter l'altération engendrée au niveau du tubes germinaux

DISCUSSION GENERALE

L'objectif de ce travail était d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de défense du palmier dattier contre la maladie du Bayoud et de montrer le rôle de l'acide salicylique dans l'établissement de la résistance. Nous avions aussi voulu déterminer le degré de protection conféré aux plantules du palmier dattier à la suite de leur traitement par l'acide salicylique ou par des bactéries antagonistes de l'agent pathogène. Notre but ultime était de déboucher sur une application susceptible de limiter les dégâts de la maladie de Bayoud *in situ*.

L'agent pathogène utilisé dans nos expériences est la souche ZAG de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* connue pour son agressivité vis-à-vis du palmier dattier. Alors que le matériel végétal est constitué de plantules issues de la germination des graines des cultivars Jihel (sensible) et Bousthami noir (résistant), très présents au Maroc. Un des problèmes majeurs que nous avons rencontré, c'est le fait que le palmier dattier est une plante dioïque et hétérozygote et les plantules issues des graines des cultivars résistants ou sensibles au Bayoud ne sont pas toutes résistantes ou sensibles. Ce problème nous a amené à ne considérer que les plantules provenant du cultivar Jihel dans la plupart des travaux réalisés. Actuellement, avec la disponibilité des vitroplants issus de la multiplication du palmier dattier par culture *in vitro*, ce problème pourrait être dépassé.

Les plantules injectées par le pathogène ont montré un brunissement qui s'étend de part et d'autre du site de l'inoculation entraînant le ramollissement de la racine. Cette dernière finit par se vider complètement de son contenu en même temps que la feuille s'enroule sur elle-même et flétrit annonçant la mort de la plante. Au niveau cellulaire, on a pu mettre en évidence, utilisant la microscopie électronique, que le pathogène envahit les tissus racinaires en empruntant les plasmodesmes et en attaquant les parois et les organites cellulaires engendrant ainsi une désorganisation totale du contenu cytoplasmique qui se réduit à des restes vésiculaires.

Lorsque les racines sont mises en présence de l'extrait fusarique du Foa, des molécules pariétales disparaissent. La technique immunohistochimique appliquée aux cellules bordantes, observées pour la première fois chez le palmier dattier dans ce travail, a permis de montrer que l'extrait fusarique du Foa, contient des enzymes hydrolytiques responsables de la disparition des composés pectiques (type xylogalacturonanes) et hemicellulosiques (type xyloglucanes) des parois cellulaires. Ceci corrobore le résultat rapporté par El Modafar et El

Boustani (2000), décrivant la sécrétion d'enzymes lytiques par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* lors de son interaction avec le palmier dattier.

Parfois le pathogène n'arrive pas à coloniser la plante, il reste confiner au niveau du site de l'inoculation. Une nécrose localisée ressemblant à celle obtenue lors de la réaction hypersensible se forme et la plante ne montre pas les symptômes de la maladie. Ceci nous a conduits à considérer la formation de la nécrose localisée comme indicateur de la résistance du palmier dattier au Bayoud et l'étalement du brunissement comme marqueur de la maladie. Ce dernier constat est confirmé à la suite de la coloration des racines infectées du palmier dattier par le WGA (wheat germ agglutinin) qui marque spécifiquement les parois cellulaires du mycélium fongique. Cette coloration a permis de corrélér entre la formation de la nécrose localisée et l'absence de colonisation de la racine par l'agent pathogène.

Induction du métabolisme phénolique par l'acide salicylique et établissement de la résistance

Lorsque les plantules issues des graines de Jihel sont traitées par le SA, une diminution significative de la sensibilité du palmier dattier au Foa a été notée. Ce résultat est obtenu en corrélation avec une augmentation de la teneur des composés phénoliques. Cette augmentation est vraisemblablement due à l'activation de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) mise en évidence à la suite du traitement des racines par le SA. La stimulation de l'activité PAL a souvent été corrélée avec la teneur du SA (Patel et al., 2004) et avec la résistance des plantes aux pathogènes (Arfaoui et al. 2007 ; Wang et al., 2008). Le résultat obtenu est en accord avec les travaux d'El Modafar et al. (2001) qui ont rapporté que la différence d'induction des réactions de défense, notée entre les plantules sensibles et résistantes du palmier dattier à la suite de leur inoculation par l'agent pathogène, est liée à une différence d'activation de la PAL. En outre, nous avons aussi noté que l'accumulation des composés phénoliques survenue à la suite du traitement par le SA, est plus importante lorsque les plantules sont aussi inoculées par le pathogène. Ceci corrobore les résultats de Kauss et al. (1992) qui confirment que le SA n'induit pas directement l'expression des gènes de résistance mais plutôt augmente la sensibilité des cellules à répondre plus efficacement à une élicitation ultérieure (priming). Ceci suggère, qu'en plus de l'acide salicylique, des éliciteurs d'origine fongique sont nécessaires pour stimuler efficacement l'activité PAL et produire les composés phénoliques (figure 1). Des éliciteurs de nature glucidique ont été décrits dans la paroi du mycélium du Foa (El Modafar et al., 2001).

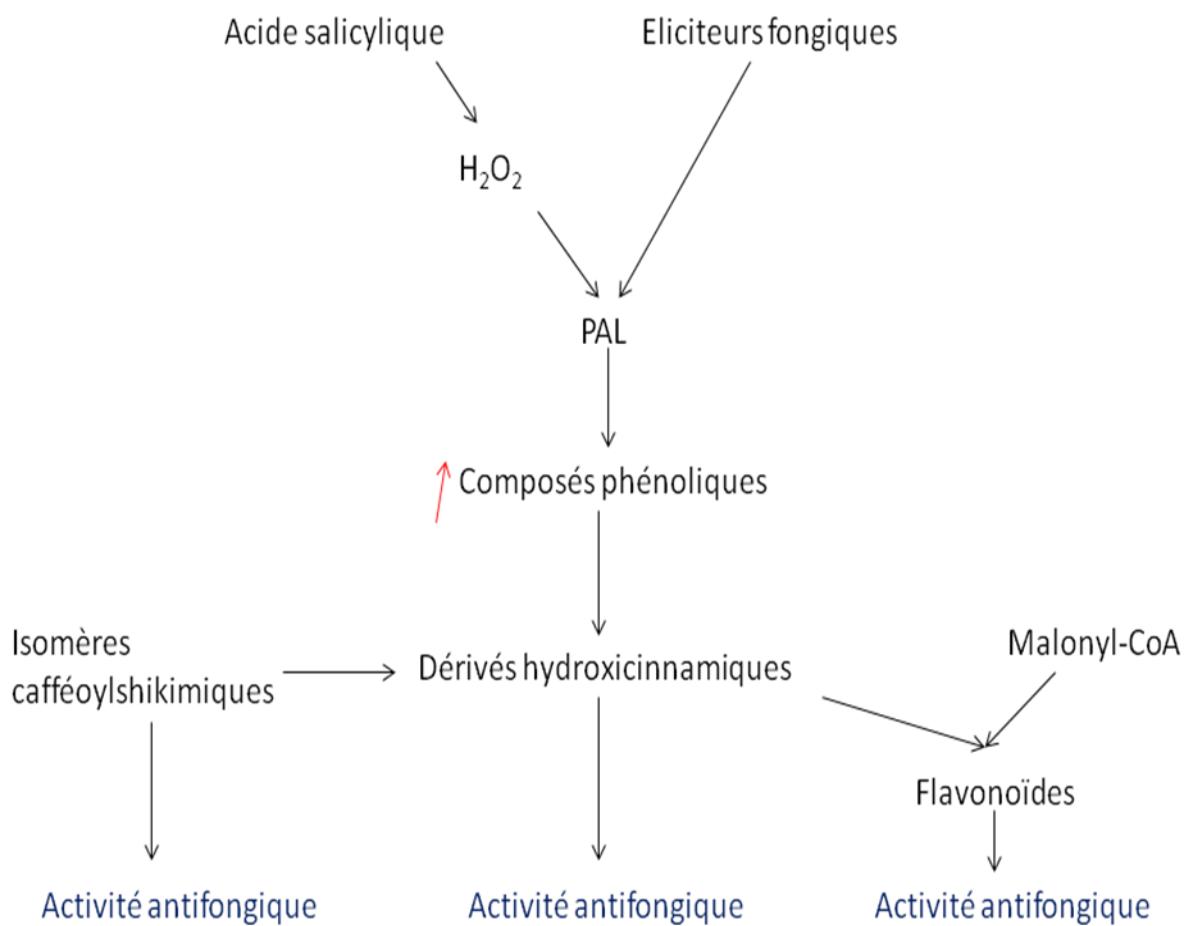


Figure 1 : Voies des phénylpropanoïdes proposées dans la défense du palmier dattier contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*

Un des scenarios possibles pour expliquer la stimulation de l'activité PAL par le SA serait par l'intermédiaire de l'augmentation de H₂O₂ notée dans les racines du palmier dattier prétraitées par l'acide salicylique avant d'être inoculée par Foa. Cette augmentation pourrait être à l'origine de l'activation de l'expression des gènes PAL (Desikan et al. 1998) aboutissant à la synthèse des composés phénoliques (Dorey et al. 1997).

De plus, l'accumulation des composés phénoliques notée dans les racines inoculées par le pathogène ou dans celles inoculées par le pathogène et traitées par le SA, est plus marquée dans le cas des plantules asymptomatiques issues du cultivar sensible (JHL) que dans celui des plantules provenant du cultivar résistant Boushami noir (BSTM). Ce résultat diffère de celui décrit par Ziouti (1998) postulant que les cultivars résistants réagissent plus efficacement à l'infection par Foa que les cultivars sensibles. Ceci est sans doute dû au fait que dans nos travaux, nous avons considéré les plantules issues du cultivar sensible, ne présentant pas les symptômes du Bayoud. Cette différence de réaction de défense entre les plantules issues des cultivars résistant et sensible laisse penser que les teneurs en composés phénoliques du cultivar résistant étaient suffisantes pour stopper le pathogène et que dans ce cas la plante n'avait pas besoin d'une activation supplémentaire de son métabolisme phénolique pour résister au Bayoud.

Par ailleurs, la caractérisation des composés phénoliques par HPLC a permis de mettre en évidence des isomères des acides cafféoylshikimiques exprimés de manière constitutive par les racines du palmier dattier. Malgré que ces acides cafféoylshikimiques ont montré, *in vitro*, une activité antifongique vis-à-vis du Foa (Ziouti et al., 1996), les teneurs atteintes à la suite de l'infection par le pathogène ne sont pas suffisantes pour expliquer le niveau de résistance obtenu chez certains cultivars de palmier dattier (El Modafar, 2010). Ce qui suggère l'intervention d'autres composantes dans la réaction de défense du palmier dattier contre son pathogène. A côté des acides cafféoylshikimiques, nous avons pu mettre en évidence l'induction de nouveaux composés phénoliques au niveau des racines traitées par le SA et inoculées par le pathogène. Ces composés phénoliques induits sont identifiés comme des dérivés des acides hydroxicinnamiques et présentent une forte activité antifongique (El Hadrami et al., 1997). Leur accumulation serait à l'origine de l'amélioration de la résistance du palmier dattier au Bayoud à la suite du traitement par le SA.

Lorsque nous avons eu recours à l'analyse histochimique afin de caractériser les composés phénoliques au niveau des tissus racinaires, nous avons pu mettre en évidence la présence des flavonoïdes au niveau des parois cellulaires du parenchyme vasculaire étroitement associé aux vaisseaux du xylème. Ces flavonoïdes pourraient intervenir dans la défense du palmier dattier

à travers leur activité antimicrobienne (Dixon, 1999) et leur rôle dans la formation de la nécrose localisée (Dai et al., 1995). L'implication des flavonoïdes dans la résistance des plantes aux pathogènes a été récemment décrite dans plusieurs travaux (Henriquez et al., 2012 ; Kröner et al., 2012). Les résultats trouvés dans ce travail suggèrent que les flavonoïdes ne sont exprimés que chez les plantules prétraitées avec le SA et inoculées par le pathogène. Ceci confirme l'implication du SA dans la sensibilisation des tissus du palmier dattier leur permettant de répondre de manière plus efficace à l'attaque parasitaire. Les flavonoïdes révélés par histochimie, pourraient provenir des dérivés hydroxycinnamiques induits, par condensation du ρ -coumaroyl-CoA, un dérivé hydroxycinnamique, avec le malonyl-CoA (figure 1).

Par ailleurs, l'observation à l'échelle ultrastructurale des tissus traités par le SA a permis de mettre en évidence la déposition d'un matériel dense aux électrons étroitement associé aux espaces intercellulaires. Le mycélium fongique près de ce matériel est souvent altéré et déformé. La nature de ce matériel n'est pas encore déterminée, la corrélation entre les observations microscopiques et les analyses histochimiques, et la comparaison de nos résultats avec ceux du Valette et al. (1998), portent à croire qu'il est, au moins en partie, constitué par des flavonoïdes.

Tous ces changements structuraux et biochimiques sont susceptibles de contribuer à la formation de barrières visant l'arrêt de la progression du pathogène dans les tissus de l'hôte.

Intervention de l'acide salicylique dans la mort cellulaire associée à la réaction hypersensible

La nécrose formée dans les racines du palmier dattier à la suite de leur traitement par le SA ressemble à celle obtenue lors de la réaction hypersensible (HR) des plantes aux pathogènes. Cette réaction est souvent associée avec la mort cellulaire et vise la restriction de l'agent pathogène au niveau du site de l'infection (Hammond-Kosack et Jones, 1996). Les résultats obtenus dans ce travail permettent d'établir une relation entre la formation de la nécrose localisée et l'accumulation de H_2O_2 , survenue au niveau du site de l'inoculation du pathogène, à la suite du traitement des racines par le SA. H_2O_2 est connu comme molécule signale indispensable à la mort cellulaire programmée (Van Breusegem, 2006). Ceci est confirmé dans le pathosystème palmier dattier-Foa, dans lequel nous avons noté une stimulation de la peroxydation des lipides, marqueur de la mort cellulaire, dans les racines ayant présenté des teneurs élevées en H_2O_2 . La cause vraisemblable de l'accumulation de H_2O_2 , serait

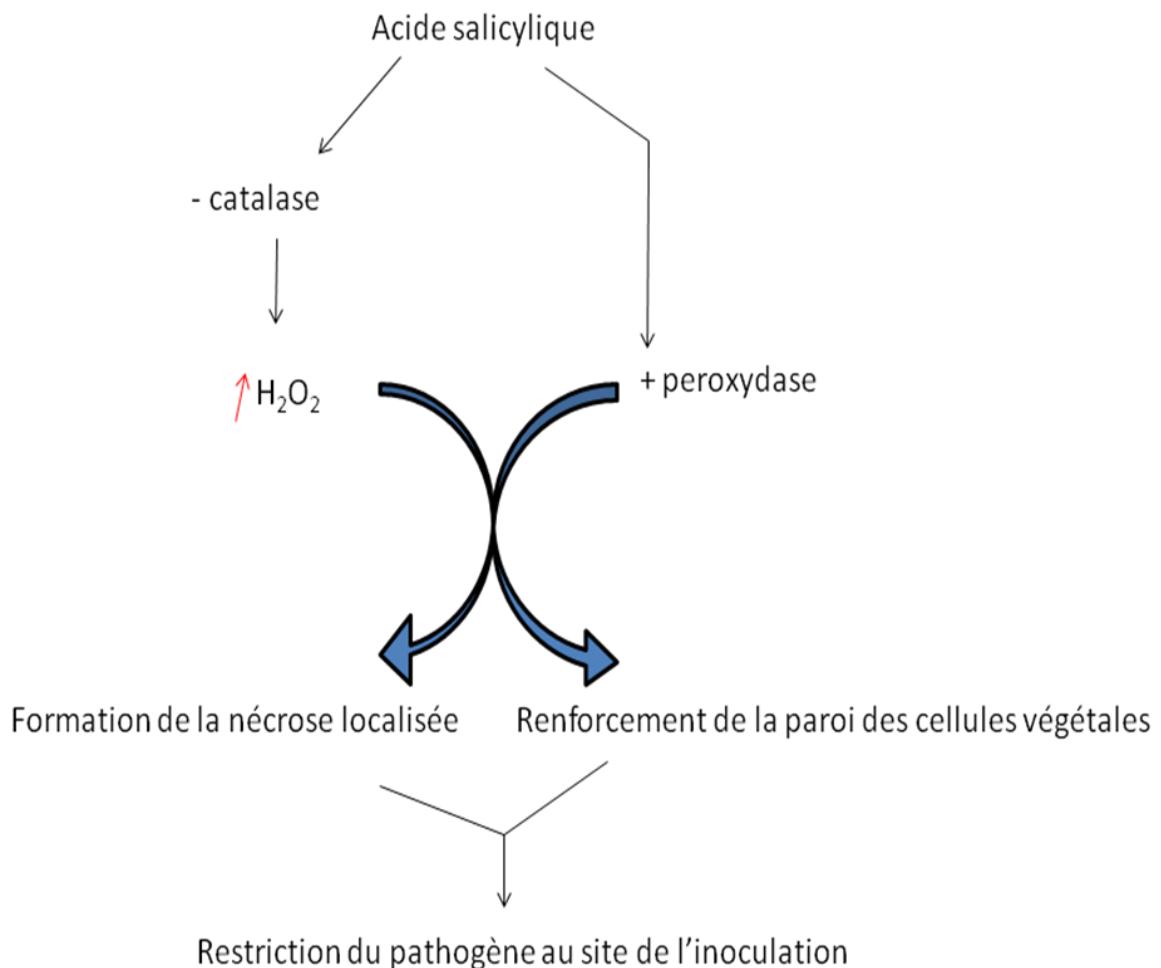


Figure 2 : Schémas présentant une proposition de l'effet de l'acide salicylique sur certaines activités enzymatiques en relation avec l'établissement de la résistance du palmier dattier contre *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis*

l'inhibition de l'activité catalase notée à la suite du traitement des racines de palmier dattier par le SA (figure 2). Cependant, à forte teneur en H₂O₂, le SA semble activer la catalase, vraisemblablement en relation avec l'activation du système antioxydatif susceptible de limiter les dégâts associés au stress oxydatif généré par les fortes concentrations d'H₂O₂.

Concernant l'activité peroxydase, elle a été stimulée dans les plantules à la suite de leur traitement par le SA (figure 2) avec l'apparition de nouveaux isomères de peroxydase dans les racines des plantes à la fois traitées par le SA et inoculées par le pathogène. Ceci corrobore les résultats d'El Hassni et al. (2004) et ceux de Jaiti et al. (2009) qui ont rapporté, que l'élicitation des racines de palmier dattier par des souches hypoagressives de Foa ou par l'acide jasmonique, engendre l'activation de la peroxydase. Les peroxydases sont impliquées dans plusieurs processus associés à la défense des plantes contre les agents pathogènes (Almagro et al., 2009). L'expression de ces nouveaux isomères de peroxydase pourrait être due à une mise en alerte « ou priming » de la plante suite au traitement par le SA. Ce résultat est consolidé par le travail de Patel et al. (2004) qui ont suggéré que l'accumulation du SA est nécessaire à l'activation de la peroxydase. Les résultats d'histolocalisation viennent préciser que ce sont les cellules des parenchymes vasculaire et cortical qui sont impliquées dans cette activation de la peroxydase.

D'autre part, la stimulation de la peroxydase a coïncidé avec l'accumulation de H₂O₂. Ceci laisse penser que le SA agirait en déclenchant l'accumulation de H₂O₂ essentielle à la réticulation des composés pariétaux par les peroxydases. Ce renforcement des parois cellulaires est susceptible d'empêcher la progression de l'agent pathogène et de le restreindre au niveau du site de l'inoculation (Almagro et al. 2009).

La lutte biologique, une stratégie prometteuse pour combattre la maladie du Bayoud

Cette partie fait suite aux travaux de notre équipe dans lesquels nous avons tenté le contrôle biologique du Bayoud par des souches hypoagressives de Foa (El Hassni et al., 2004) ou par des endomychorizes (Jaiti et al., 2008). Le travail réalisé ici avait pour objectif de tester deux bactéries, *Bacillus amyloliquefaciens* (Ag) et *Burkholderia cepacia* (Cs), pour leur rôle potentiel dans le contrôle de la maladie du Bayoud. Les deux bactéries ont montré un degré significatif d'inhibition de la croissance et de la conidiogénèse du pathogène. Elles agissent en libérant des molécules antifongiques qui limitent la croissance du pathogène. Kelani-Feki et al. (2011) a isolé le didecyl-phtalate et l'alkyl-quinone à partir du surnageant de *Burkholderia cepacia* (Cs), ces molécules ont présenté une activité antifongique vis-à-vis de nombreux champignons.

De plus, des altérations morphologiques, décrites pour la première fois dans ce travail, ont été notées au niveau du mycélium du Foa lors des co-cultures avec les bactéries antagonistes. Il s'agit de la vacuolisation du cytoplasme et du gonflement des fragments du mycélium de l'agent pathogène.

Par ailleurs, nous avons examiné la possibilité d'induction des réactions de défense du palmier dattier par l'utilisation des deux bactéries, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Burkholderia cepacia*. Les résultats ont montré que le prétraitement des racines du palmier dattier par les deux bactéries a réduit de manière significative la taille de la zone de brunissement tout autour du site d'inoculation du Foa et a conduit à la formation d'une nécrose localisée. Quand la nécrose est formée, les symptômes de la maladie sont réduits et la plante apparaît plus résistante. Ceci traduit la restriction du pathogène au niveau du site de l'inoculation. Une telle restriction a déjà été décrite dans d'autres pathosystèmes et a été positivement corrélée à la résistance des plantes aux pathogènes (Benhamou et al., 1996a).

En plus, une augmentation marquée de l'activité peroxydase et des nouveaux isomères de cette enzyme ont été notés surtout pour les racines ayant été infiltrées par les bactéries avant d'être inoculées par le pathogène. Ceci est en accord avec les travaux ayant décrit la stimulation des réactions de défense des racines du palmier dattier à la suite de leur élicitation par un isolat hypoagressif de Foa (El Hassni et al., 2004). Cela pourrait renforcer les parois cellulaires des plantes limitant ainsi l'invasion des tissus par les agents pathogènes (Pomar et al., 2004).

La plupart des isoenzymes induites dans les racines du palmier dattier sont aussi exprimées dans les racines traitées par l'acide jasmonique (Jaiti et al., 2009). Ceci est en accord avec l'intervention d'une voie de résistance se rapprochant de la voie de la résistance systémique induite (SIR).

En outre, l'effet de ces deux bactéries sur le métabolisme phénolique a été examiné. Nous avons montré que les composés phénoliques synthétisés sont différents selon que les plantes sont inoculées par le pathogène ou par les bactéries. Le pathogène fait légèrement augmenter les isomères des acides cafféoylshikimiques, alors que les deux bactéries induisent, de manière modérée, la synthèse de nouveaux composés phénoliques, identifiés comme des dérivés des acides hydroxycinnamiques différents de ceux induits par le SA. Ce résultat nous a conduits à suggérer l'intervention de deux voies différentes du métabolisme phénolique, elles dépendent de la nature des éliciteurs (figure 3). La première voie nécessite des éliciteurs provenant du pathogène et conduit à l'amplification des isomères des acides

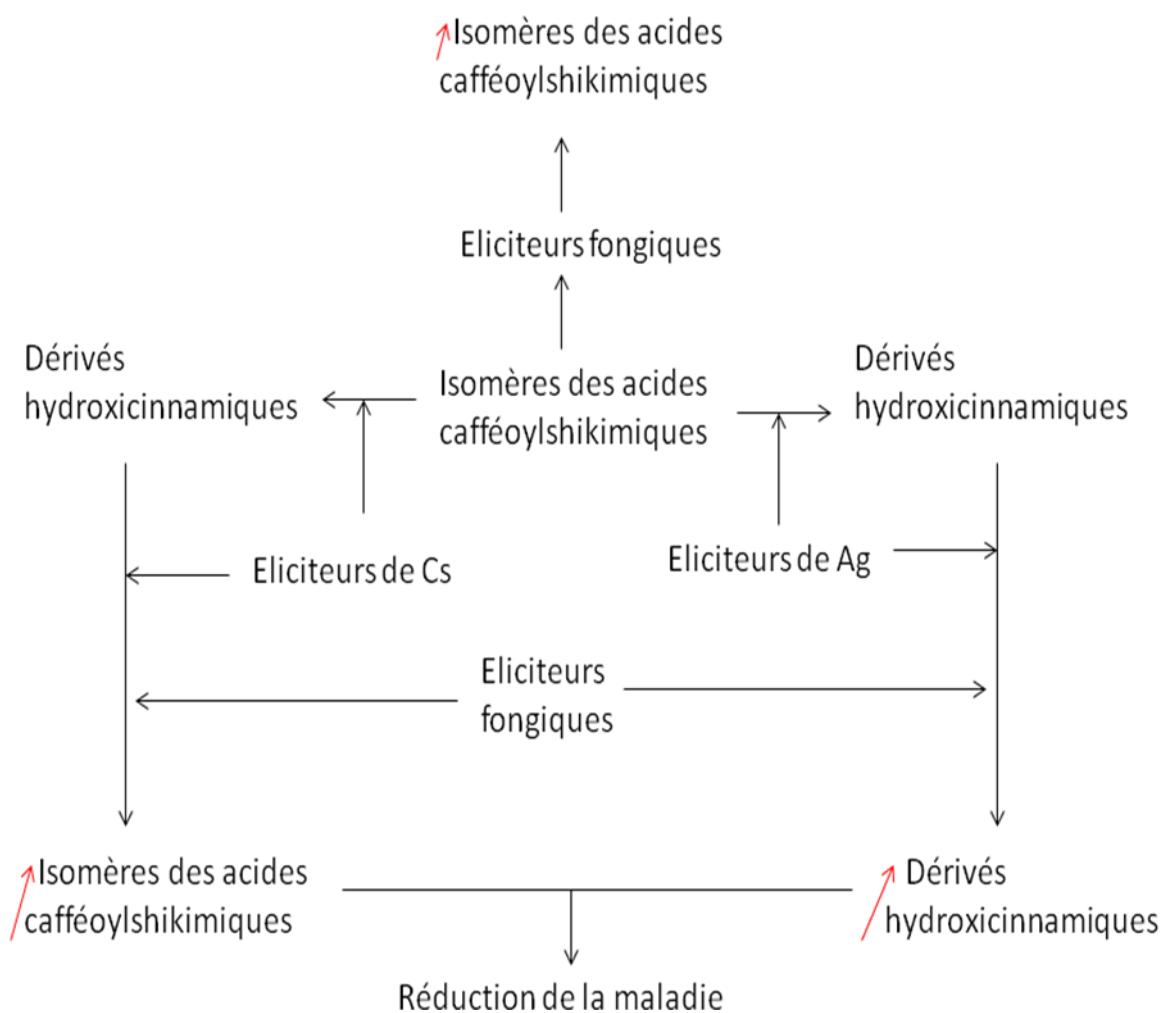


Figure 3 : Schéma simplifié des deux voies des phénylpropanoïdes impliquées dans la défense du palmier dattier

cafféoylshikimiques, alors que la deuxième nécessite des éliciteurs bactériens et conduit à l'induction des dérivés des acides hydroxicinnamiques. Cette altération du métabolisme phénolique a aussi été décrite dans d'autres études récentes en relation avec l'établissement de la résistance des plantes aux pathogènes (Henriquez et al., 2012 ; Kröner et al., 2012).

En combinant le pathogène et les bactéries, il semble que les deux voies entre en compétition et l'une ou l'autre finit par prendre le dessus engendrant soit des isomères des acides cafféoylshikimiques ou bien des dérivés des acides hydroxicinnamiques. Dans les deux cas, la stimulation de la synthèse des composés phénoliques est corrélée avec l'établissement de la résistance.

Le résultat encourageant que nous avons obtenu pour ces deux bactéries, nous a poussés à chercher d'autres microorganismes susceptibles d'inhiber le développement du Foa. Cette recherche a été menée dans le compost de grignon en se référant aux travaux de Souna et al. (2010) qui ont rapporté que la résistance du palmier dattier au Bayoud a été améliorée par le compost. Nous avons pu sélectionner deux champignons, *Penicillium notatum* et *Aspergillus fumigatus*, et une bactérie *Pseudomonas aeruginosa* car ils ont montré, *in vitro*, un degré d'inhibition significatif du développement du Foa. La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (Cp2Co5) mérite une attention particulière pour le fait qu'elle n'a pas présenté d'effet néfaste sur les plantules du palmier dattier d'une part et pour les altérations cytologiques marquées (déchirure de la paroi, expulsion du contenu cytoplasmique) qu'elle a engendré au niveau du mycélium du Foa d'autre part.

Le travail réalisé au cours de cette thèse a permis de:

- démontrer que le SA est impliqué dans la défense du palmier dattier contre Foa, il intervient en augmentant la sensibilité de la plante afin de réagir plus efficacement contre l'attaque parasitaire (priming),
- montrer que ce sont les tissus racinaires des parenchymes vasculaire et cortical qui sont impliqués dans la défense du palmier dattier,
- contribuer à la caractérisation des voies du métabolisme phénolique impliquées dans la défense du palmier dattier contre son pathogène,
- tester et sélectionner des microorganismes pour leur rôle dans le contrôle biologique de la maladie du Bayoud.

Les résultats obtenus présentent un double intérêt,

- Une meilleure compréhension des mécanismes de défense du palmier dattier contre sa fusariose vasculaire et du rôle de l'acide salicylique dans l'établissement de la résistance
- La possibilité d'engager un programme de lutte contre le Bayoud par arrosage des palmeraies par l'acide salicylique ou par des suspensions de microorganismes antagonistes du Foa ou encore par apport de compost de grignon enrichi en ces microorganismes aux sols des palmeraies contaminées.

De nombreuses questions restent ouvertes et plusieurs problèmes restent à résoudre, notamment:

- L'approfondissement des connaissances concernant les voies des phénylpropanoïdes impliquées dans la défense du palmier dattier contre son pathogène,
- La recherche des modalités d'action des différents microorganismes testés sur Foa,
- L'étude de l'induction des mécanismes de défense du palmier dattier par *Pseudomonas aeruginosa*.

Certains de ces problèmes sont en cours de résolution, d'autres donnent toujours du fil à retordre pour des futures investigations. Une convention avec le Domaine El Bassatine de Meknès a été signée en vue de tester dans un champ contaminé par le Bayoud au Maroc (régions de Tata et d'Errachidia) le degré de protection que nos bactéries (combinaison Cp2Co5 et Ag1) pouvaient conférer à des vitroplants de palmier dattier issus des cultivars Mejhoul et Boufegouss et Najda. Les deux premiers cultivars sont sensibles à la maladie

du Bayoud et sont de haute qualité dattière alors que le cultivar Najda est résistant et de haute qualité dattière.

Il reste clair que les méthodes utilisées pour le contrôle du Bayoud ne permettent pas de résoudre définitivement le problème de cette maladie. Il est donc impératif de poursuivre la recherche en vue d'établir la meilleure combinaison des traitements susceptible de conférer une protection maximale du palmier dattier contre la maladie du Bayoud.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Able AJ.** (2003) Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens. *Protoplasma*, 221: 137-143.
- Adam A, Farkas T, Somlayai G, Hevesi M, Kiraly Z.** (1989) Consequence of O₂– generation during bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. *Physiol Mol Plant Pathol*, 34: 13-26.
- Adie BAT, Pérez-Pérez J, Pérez-Pérez MM, Godoy M, Sanchez-Serrano JJ, Schmelz EA, Solano R.** (2007) ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation od defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19 : 1665-1681.
- Alibert G, Ranjeva R.** (1971) Recherches sur les enzymes catalysant la formation des acides phénoliques chez *Quercus pedunculata* (Ehrh.). I. Formation des premiers termes des séries cinnamique et benzoïque. *FEBS Lett*, 19 : 11-14.
- Almagro L, Gómez Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barcelo A, Pedrenô MA.** (2009) Class III peroxidases in plant defence reactions. *J Exp Bot*, 60: 377-390
- Amraoui H.** (1993) Fusariose vasculaire du palmier dattier (Bayoud) mise en évidence d'enzymes à activité antifongique chez la plante (Dosage des activités chitinases et B-1,3 glucanases) et étude des sécrétions protéiques du champignon (Dosage des activités cellulases, pectinases et protéases). Thèse de Troisième Cycle, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc, 94p
- Amraoui H, Lazrek HB, Hamdaoui A, Sedra MH.** (2005) Mise en évidence d'enzymes à activité antifongique chez le palmier dattier: dosage des activités chitinases et β 1-3 glucanases, comme réaction au *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*, agent causal du Bayoud. *Al Awamia*, 116: 18-34.
- Anand A, Uppalapati SR, Ryu CM, Allen SN, Kang L, Tang Y, Mysore KS.** (2008) Salicylic acid and systemic acquired resistance play a role in attenuating crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol*, 146: 703-715
- Anderson MD, Zhixiang C, Klessig DF.** (1998) Possible involvement of lipid peroxidation in salicylic acid-mediated induction of PR-1 gene expression. *Phytochem* 47: 555-566
- Anfoka G, Buchenauer H.** (1997) Systemic acquired resistance in tomato against *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with tobacco necrosis virus, *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 50: 85–102.
- Anzlovar S, Dermastia M.** (2003) The comparative analysis of osmo-tins and osmotin-like PR-5 proteins. *Plant Biol*, 5:116–24.
- Apel K, Hirt H.** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol*, 55:373–99.
- Arfaoui A, El Hadrami A, Mabrouk Y, Sifi B, Boudabous A, El Hadrami I, Daayf F, Cherif M.** (2007) Treatment of chickpea with Rhizobium isolates enhances the expression of phenylpropanoid

- defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, Plant Physiol. Biochem, 45 : 470-479.
- Assef GM.** (1987) Résistance chimique du palmier dattier au Bayoud. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Aix Marseille.
- Athukorala SNP, Fernando WGD, Rashid KY.** (2009) Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry, Can. J. Microbiol, 55 : 1021-1032.
- Baaziz M.** (1989) The activity and preliminary characterization of peroxidases in leaves of cultivars of date palm, *Phoenix dactylifera* L. New Phytol, 111:403-411.
- Baaziz M.** (1990) Contribution à l'étude des peroxydases du palmier dattier, *Phoenix dactylifera* L. relation avec la résistance de la plante à la maladie du bayoud, Fusariose vasculaire à *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc 173 p.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM.** (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annu. Rev. Plant Biol, 57: 233–266.
- Bakker PAHM, Pieterse CMJ, Van Loon LC.** (2007) Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. Phytopathology, 97: 239-243.
- Bauer DW, Wei ZM, Beer SV, Collmer A.** (1995) *Erwinia chrysanthemi* Harpin: an elicitor of the hypersensitive response that contributes to soft-rot pathogenesis. Mol. Plant-Microbe Interact, 8: 484-491.
- Becana M, Moran JF, Ormaetxe II.** (1998) Iron dependant oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: Toxicity and antioxidant protection. Plant soil 201: 137-147.
- Beckers GJM, Spoel SH.** (2006) Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. Plant Biology, 8: 1–10.
- Benhamou N.** (1996) Elicitor-induced plant defense pathways. Trends Plant Sci, 1:233-240.
- Benhamou N, Bélanger RR, Paulitz TC.** (1996b) 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*, Phytopathol, 86: 1174-1185.
- Benhamou N, Bélanger RR.** (1998) Benzothiadiazolemediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. Plant Physiol, 118: 1203–1212.
- Benhamou N, Kloepper JW, Quadt-Hallman A, Tuzun S.** (1996a) Induction of defenserelated ultrastructural modifications in Pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. Plant Physiol, 112: 919-929.
- Benslimane A.** (1995) Plasmides mitochondriaux du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Mise en évidence et caractérisation moléculaire. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Cadi Ayyad, Marrakech.

- Benslimane A, Rode A, Quétier F, Hartmann C.** (1994) Characterization of two minicircular plasmid-like DNAs isolated from date-palm mitochondria. *Curr Genet*, 26: 535-41.
- Benzaza HB, Brochard P, Dubost D, Hethener P.** (1970) Progression du Bayoud en Algérie et résultats des prospections entreprises. In: Travaux sur le Bayoud, 1969-70, MARRA-PV, Congrès Maghrébin d'Agronomie Saharienne.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedet KV.** (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Botany*, 91:179-194.
- Boisson B, Meinnel T.** (2003) A continuous assay of myristoyl-CoA: protein N myristoyltransferase for proteomic analysis. *Anal Biochem*, 322, 116-123.
- Boller T.** (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol*, 46 : 189-214.
- Boller T, He SY.** (2009) Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Sci*, 324: 742-744.
- Bolwell GP, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F, Rowntree EG, Wojtaszek P.** (1999) Recent Advances in Understanding Origin of the Apoplastic Oxidative Burst in Plant Cells. *Free Rad Res*, 31: 137-145.
- Bolwell GP, Butt VS, Davies DR, Zimmerlin A.** (1995) The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radical Research*, 23: 517–532.
- Bostock RM, Kuc JA, Laine RA.** (1981) Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. *Science*, 212: 67-69
- Bostock, RM, Wilcox SM, Wang G, Adaskaveg JE.** (1999) Suppression of *Monilinia fructicola* cutinase production by peach fruit surface phenolic acids. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 54: 37–50.
- Bouâchrine B.** (1997) Distribution des plasmides mitochondriaux R et S chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Mise au point d'une technique de détection par PCR. Marrakech: Diplôme des Etudes Supérieures, Université Cadi Ayyad.
- Bouchez O, Huard C, Lorrain S, Roby D, Balague C.** (2007) Ethylene is one of the key elements for cell death and defense response control in the *Arabidopsis* lesion mimic mutant *vad1*. *Plant Physiol*, 145: 465-477.
- Boudart G, Dechamp-Guillaum G, Lafitte C, Ricart G, Barthe JP, Mazau D, Esquerre-Tugayé MT.** (1995) Elicitors and suppressors of hydroxyproline-rich glycoprotein accumulation are solubilized from plant cell walls by endopolygalacturonase. *Eur. J. Biochem*, 232 : 449-457.
- Bouizgarne B, Brault M, Pennarun M, Rona JP, Ouhdouch Y, El Hadrami I, Bouteau F.** (2004) Electrophysiological response to fusaric acid of root hairs from seedlings of date palm susceptible and resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. albedinis. *J. Phytopathol*. 152: 321-324.
- Boumedjout H.** (2010) Morocco markets Bayoud-resistant strains of date palm, *Nature Middle East* 220, doi: 10.1038/nmiddleeast, 220.

- Bounaga N.** (1975) Germination de microconidies et macroconidies de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle d'Afrique du Nord, 66 : 39-44.
- Bradford MM.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. An Biochem, 72: 248-254.
- Brisson LF, Tenhaken R, Lamb C.** (1994) Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. Plant cell, 6: 1703-1712.
- Brochard P, Dubost D.** (1970a) Progression du Bayoud dans la palmeraie d'In-Salah (Tidikelt, Algérie). Al Awamia 35 : 143-153.
- Brochard P, Dubost D.** (1970b) Observations sur de nouveaux foyers de Bayoud dans le département des oasis (Algérie). Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle d'Afrique du Nord, 60 : 185-193.
- Brown I, Trethowan J, Kerry M, Mansfield JW, Bolwell GP.** (1998) Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between nonpathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. Plant J, 15: 333-343.
- Buensanteai N, Yuen GY, Prathuangwong S.** (2008) The Biocontrol Bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 Produces Auxin, Surfactin and Extracellular Proteins for Enhanced Growth of Soybean Plant, Thai J. Agricul. Sc, 41: 101-116.
- Bulit J, Bouhot D, Louvet J, Toutain G.** (1967) Recherches sur les fusariose. Travaux sur le Bayoud fusariose vasculaire du palmier dattier en Afrique du Nord. Annales des Epiphyties, 18 : 213-239.
- Cameron RK, Paiva NL, Lamb CJ, Dixon RA.** (1999) Accumulation of salicylic acid and PR-1 gene transcripts in relation to the systemic acquired resistance (SAR) response induced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in *Arabidopsis*. Physiol. Mol. Plant Pathol, 55: 121–130.
- Cao H, Li X, Dong X.** (1998) Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. Proc Natl Acad Sci USA, 95: 6531-6536.
- Carlsen SCK, Understrup A, Fomsgaard IS, Mortensen AG, Ravnskov S.** (2008) Flavonoids in roots of white clover: interaction of arbuscular mycorrhizal fungi and a pathogenic fungus. Plant and Soil, 302: 33–43.
- Chakroune K, Bouakka M, Lahlali R, Hakkou A.** (2008) Suppressive effect of mature compost of date palm by-products on *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Plant Pathol, 7: 148-54.
- Chaouch S, Queval G, Vanderauwera S, Mhamdi A, Vandorpe M, Langlois-Meurinne M, Van Breusegem F, Saindrenan P, Noctor G.** (2010) Peroxisomal hydrogen peroxide is coupled to biotic defense responses by isochorismate synthase 1 in a daylength-related manner. Plant Physiol, 153: 1692-1705

- Chen C, Belanger RR, Benhamou N, Paulitz TC.** (2000) Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth promoting rhizobacteria, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 56: 13–23.
- Chen X, Scholz R, Borriss M, Junge H, Mogel G, Kunz S, Borriss R.** (2009) Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J. Biotech.*, 140: 38-44.
- Chen Z, Klessig DF.** (1991) Identification of a soluble salicylic acid binding protein that may function in signal transduction in the plant disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 8179–8183.
- Chen Z, Malamy J, Henning J, Conrath U, Sanchez-Casas P, Silva H, Ricigliano J, Klessig DF.** (1995) Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4134-4137
- Chen Z, Silva S, Klessig D.** (1993) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 262: 1883–1886.
- Chérif M, Sadfi N, Benhamou N, Boudabbous A, Boubaker A, Hajlaoui MR, Tirilly Y.** (2002) Ultrastructure and cytochemistry of in vitro interactions of the antagonistic bacteria *Bacillus cereus* X16 and *B. thuringiensis* 55T with *Fusarium roseum* var. *sambucinum*, *J. Plant Pathol.*, 84 : 83–93.
- Cherrab M.** (1989) Contribution à l'étude morphologique et biochimique de quelques formes spéciales de *Fusarium oxysporum* (Schlecht.). Marrakech: Diplôme d'Etudes Supérieures, Université Cadi Ayyad.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ.** (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124: 803–814.
- Churngchow N, Rattarasarn M.** (2001) Biosynthesis of scopoletin in *Hevea brasiliensis* leaves inoculated with *Phytophthora palmivora*. *J Plant Physiol.*, 158: 875–882
- Compart S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Ait Barka E.** (2005) Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Appl. Env. Microbiol.*, 71: 4951–4959.
- Cona A, Rea G, Botta M, Corelli F, Federico R, Angelini R.** (2006) Flavin-containing polyamine oxidase is a hydrogen peroxide source in the oxidative response to the protein phosphatase inhibitor cantharidin in *Zea mays* L. *J Exp Bot.*, 57: 2277-2289.
- Cosgrove DJ.** (2005) Growth of the plant cell wall. *Nature Rev. Mol. Cell Biology Biol.*, 6:850-861.
- Costet L, Fritig B, Kauffmann S.** (2002) Scopoletin expression in elicitor-treated and tobacco mosaic virus-infected tobacco plants. *Physiol. Plant*, 115: 228–235.
- Croft KPC, Voisey CR, Slusarenko AJ.** (1990) Mechanisms of hypersensitive cell collapse: correlation of increased lipoxygenase activity with membrane damage in leaves of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with an avirulent race of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 36: 49-62.

- Cruickshank IAM.** (1963) Phytoalexins. Ann. Rev. Phytopathol, 1: 351–374.
- Crute IR, Holub EB, Burdon JJ.** (1997) The gene for gene relationship in plant parasite interactions. New York: CAB International, pp. 359–378.
- Curir P, Dolci M, Lanzotti V, Taglialatela-Scafati O.** (2001) Kaempferide triglycoside, a possible factor of resistance of carnation (*Dianthus caryophyllus*) to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Phytochemistry, 56: 717–721.
- Curir P, Marchesini A, Danieli B, Mariani F.** (1996) 3-Hydroxyacetophenone in carnations is a phytoanticipin active against *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Phytochemistry, 41: 447–450.
- Daayf F, El Bellaj M, El Hassni M, Jaiti F, El Hadrami I.** (2003) Elicitation of soluble phenolics in date palm (*Phoenix dactylifera*) callus by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* culture medium. Env. Exp. Botany, 49:41-47.
- Dai GH, Andary C, Mondolot-Cosson L, Boubals D.** (1995) Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V.rupestris* and *V.rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*. Physiol. Mol. Plant Pathol, 46: 177–188.
- Dai GH, Nicole M, Andary C, et al.** (1996) Flavonoids accumulate in cell walls, middle lamellae and callose-rich papillae during an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. malvacearum and cotton. Physiol. Mol. Plant Pathol, 49: 285–306.
- Dangl JL, Jones JDG.** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature, 411:826–33.
- De Gara L, De Pinto MC, Tommasi F.** (2003) The antioxidant system vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. Plant Physiol. Biochem, 41: 863-870.
- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gutrella M, Kessmann H, Ward E, Ryals J.** (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. Science, 266: 1247-1250.
- Delaney TP, Friedrich L, Ryals JA.** (1995) *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 6602–6606.
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C.** (1998) Nitritic oxide functions as a signal in plant disease resistance. Nature, 394: 585-588
- Desikan R, Reynolds A, Hancock JT, Neill SJ.** (1998) Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defense gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. Biochemistry Journal, 330: 115–120.
- Diaz-Vivancos P, Rubio M, Mesonero V, Periago PM, Ros Barcelo A, Martinez-Gomez P, Hernandez JA.** (2006) The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term plum pox virus infection. J. Exp. Bot, 57: 3813–3824.
- Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ.** (1994) Early events in the activation of plant defense responses. Annu. Rev. Phytopathol, 32: 479–501.

- Dixon RA.** (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411: 843–847.
- Dixon RA.** (1999) Isoflavonoids: biochemistry, molecular biology and biological functions. In: *Comprehensive Natural Products Chemistry*, U. Sankawa, Ed., pp. 773–823, Elsevier, Amsterdam.
- Dixon RA, Paiva NL.** (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7: 1085–1097.
- Djerbi M.** (1982) Bayoud disease in North Africa: history distribution, diagnosis and control. *Date Palm Journal*, 1: 153-197.
- Djerbi M.** (1983) Diseases of the date palm *Phoenix dactylifera*. FAO, Baghdad, Iraq.
- Djerbi M, Aouad L, Filali H, Saaidi M, Chtioui A, Sedra MH, Allaoui M, Hamdaoui T, Oubrich M.** (1986) Preliminary results of selection of high-quality Bayoud-resistant clones among natural date palm population in Morocco. In: *Proceedings of the Second Symposium on the Date Palm, Saudi Arabia*, pp. 383-399.
- Djerbi M, El Ghorfi A, El Idrissi Ammari MA.** (1985) Etude du comportement du henné *Lawsonia inermis* et de la luzerne *Medicago sativa* et quelques espèces de palmacées vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, agent causal du Bayoud. *Annales de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie*, 58 : 1-11.
- Donofrio NM, Delaney TP.** (2001) Abnormal callose response phenotype and hypersusceptibility to *Peronospora parasitica* in defense-compromised *Arabidopsis thaliana* and salicylate hydroxylase-expressing plants. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 14: 439-450.
- Dorey S, Baillieul F, Pierrel MA, Saindrenan P, Fritig B, Kauffman S.** (1997) Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Mol. Plant Microbe interact*, 10: 646-655.
- Dubost D.** (1972) The Bayoud disease in Algeria, history and diagnosis. In: *Proceedings of the First International Seminar and Workshop on Bayoud*, Algiers, Algeria, pp. 83-92.
- Durrant WE, Dong X.** (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol*, 42: 185-209.
- Eitas TK, Dangl JL.** (2010) NB-LRR proteins: Pairs, pieces, perception, partners and pathways. *Curr. Op. Plant Biol*, 13: 1-6.
- El Fakhouri R.** (1993) Identification et étude de la toxicité de différents constituants peptidiques de toxines secrétées par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal du Bayoud. Marrakech: Diplôme des Etudes Supérieures, Université Cadi Ayyad.
- El Hadrami A, Adam LR, Daayf F.** (2011) Biocontrol treatments confer protection against *Verticillium dahliae* infection of potato by inducing antimicrobial metabolites. *Mol. Plant Microbe interact*, 24: 328–335.
- El Hadrami I.** (2002) Infections racinaires localisées et rôle des dérivés hydroxicinnamiques dans la résistance du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) au *Fusarium oxysporum* f. sp. *aledinis*, agent causal du Bayoud. *Polyphenols Actualités*, 22: 19-26.

- El Hadrami I, Baaziz M.** (1995) Somatic embryogenesis and analysis of peroxidase in *Phoenix dactylifera* L. Bio Plant 37: 197-203.
- El Hadrami I, Ramos T, El Bellaj M, El Idrissi-Tourane A, Macheix JJ.** (1997) A sinapic derivative as induced defense compound of date palm against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, the agent causing Bayoud disease. J Phytopathol, 145:329-333
- El Hassni M, J'Aiti F, Dihazi A, Ait Barka S, Daayf F, El Hadrami I.** (2004) Enhancement of defense responses against Bayoud disease by treatment of date palm seedling with an hypoaggressive *Fusarium oxysporum* isolate. J. Phytopathol, 152: 1-8.
- El Hassni M, Verdeil JL, El Hadrami I.** (2005) An hypoaggressive *Fusarium oxysporum* isolate induces polyphenoloxidase activity in the date palm seedlings allowing their protection against the Bayoud disease. Plant Pathol. Journal, 4: 96-102.
- El Hassni M, El Hadrami A, Daayf F, Cherif M, Ait Barka E, El Hadrami I.** (2007) Biological control of Bayoud disease in date palm: Selection of microorganisms inhibiting the causal agent and inducing defense reactions. Env. Exp. Bot, 59: 224-234.
- El Idrissi-Tourane A.** (1997) Importance des polyamines libres et conjugués et des inhibiteurs de leur biosynthèse dans les mécanismes de défense du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) vis à vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal du Bayoud. Marrakech: Diplôme des Etudes Supérieures, Université Cadi Ayyad.
- El Idrissi-Tourane A, Oihabi A, El Hadrami I.** (1995) Effet des polyamines et des inhibiteurs de leur biosynthèse sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* responsable du Bayoud chez le palmier dattier. Revue du Réseau d'Amélioration de la Production Agricole en Milieu Aride, 7 : 241–247.
- Ellard-Ivery M, Douglas CJ.** (1996) Role of jasmonates in the elicitor and wound-inducible expression of defense genes in parsley and transgenic tobacco. Plant Physiol, 112: 183–192.
- El Modafar C.** (2010) Mechanisms of date palm resistance to Bayoud disease: Current state of knowledge and research prospects. Physiol. Mol. Pl. Pathol, 74: 287-294.
- El Modafar C, El Boustani E, Rahiouï B, El Meziane A, El Alaoui-Talibi Z.** (2006) Suppression of phenylalanine ammoniaelyase activity elicited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* hyphal wall elicitor in date palm. Biol Plant, 50: 697-700.
- El Modafar C, El Boustani E.** (2001) Cell wall-bound phenolic acid and lignin contents in date palm as related to its resistance to *Fusarium oxysporum*. Biol Plant, 44: 125-30.
- El Modafar C, Tantaoui A, El Boustani E.** (1999) Time course accumulation and fungitoxicity of date palm phytoalexins towards *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. J Phytopathol, 147: 477-84.
- El Modafar C, El Boustani E.** (2000) Relationship between cell wall susceptibility to cellulases and pectinases of *Fusarium oxysporum* and susceptibility of date palm cultivars to the pathogen. Biol Plant, 43: 571-6.

- El Modafar C, Tantaoui A, El Boustani E.** (2001) Differential induction of phenylalanine ammonialyase activity in date palm roots in response to inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* and to elicitation with fungal wall elicitor. *J Plant Physiol*, 158: 715-22.
- El-Oirdi M, El-Rahman TA, Rigano L, et al.** (2011) *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in Tomato. *Plant Cell*, 23: 2405–2421.
- El-Sayed M, Verpoorte R.** (2004) Growth, metabolic profiling and enzymes activities of Catharanthus roseus seedlings treated with plant growth regulators. *Plant Growth Regulation*, 44: 53–58.
- Enyedi AJ, Yalpani N, Silverman P, Raskin I.** (1992) Localisation, conjugation and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 2480–2484.
- Esquerre-Tugayé MT, Lafitte C, Mazau D, Toppan A, Touze A.** (1979) Cell surfaces in plantmicroorganism interactions. II. Evidence for the accumulation of hydroxyprolinerich glycoproteins in the cell wall of diseased plants as a defense mechanism. *Plant Physiol*, 64: 320–326.
- Esquerre-Tugayé MT.** (1973) Influence d'une maladie parasitaire sur la teneur en hydroxyproline des parois cellulaires d'épicotyles et de pétioles de plantes de melon. *CR Acad Sci Paris*, 276 : 525-528.
- Falk A, Feys BJ, Frost LN, Jones JDG, Daniels MJ, Parker JE.** (1999) *EDS1*, an essential component of *R* gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 3292-3297.
- Farmer EE, Weber H, Vollenweider S.** (1998). Fatty acid signaling in Arabidopsis. *Planta*, 206: 167–174.
- Farrokhi N, Burton RA, Brownfield L, Hrmova M, Wilson SM, Bacic A, Fincher GB.** (2006) Plant cell wall biosynthesis: genetic, biochemical and functional genomics approaches to the identification of key genes. *Plant Biotechnol J*, 4: 145-67.
- Fauth M, Merten A, Hahn MG, Jeblick W, Kauss H.** (1996) Competence for elicitation of H₂O₂ in hypocotyls of cucumber is induced by breaching the cuticle and is enhanced by salicylic acid. *Plant Physiol*, 110 : 347–354.
- Fernandez D, Tantaoui A.** (1994) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis: for rapid characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* isolates. *Phytopath Medi*, 33: 223-9.
- Fernandez M, Lourd M, Ouinten M, Tantaoui A, Geiger JP.** (1995) Le Bayoud du palmier dattier, une maladie qui menace la phoeniciculture. *Phytoma*, 469: 36-39.
- Feys BJ, Moisan LJ, Newman MA, Parker JE.** (2001) Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *Embo J*, 20: 5400-5411.

- Fisher DB**, (1968) Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie*, 16: 92–96.
- Flor HH**. (1971) Current status of gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol*, 9:275-96.
- Friedrich L, Lawton K, Dietrich R, Willits M, Cade R, Ryals J.** (2001) *NIM1* overexpression in *Arabidopsis* potentiates plant disease resistance and results in enhanced effectiveness of fungicides. *Mol. Plant–Microbe Interact*, 14: 1114–1124.
- Fritig B, Heitz T, Legrand M.** (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr. Opin. Immunol*, 10:16-22.
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka, Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr. Opin. Plant Biol*, 9:436–42.
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J.** (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756.
- Gahan PB.** (1984) *Plant Histochemistry and Cytochemistry: An Introduction*, Academic Press, London, UK.
- Gechev T, Gadjev I, Hille J.** (2004) An extensive microarray analysis of AAL-toxin 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
- Gechev TS, Hille J.** (2005) Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *Cell Biol*, 168 : 17-20.
- Gianinazzi S, Marco Y, Milat M-L, Molot P-M, Ricci P, Rouxel T, Boistard P, Dron M, Dunez J, Bompeix G, Fritig B.** (1991) Les mécanismes de défense des plantes. Dans « Les dossiers de l'INRA, Les Relations Plantes-Microorganismes » (INRA, Paris), 20 p.
- Gianinazzi S, Martin C, Vallée JC.** (1970) Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana Xanthi* n.c. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. *CR. l'Acad Sci*, 270: 2383-86.
- Glazebrook J.** (2001) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*—2001 status. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 301–308.
- Glazebrook J.** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol*, 43: 205–227.
- Glazebrook J, Chen W, Estes B, Chang HS, Nawrath C, Métraux JP, Zhu T, Katagiri F.** (2003) Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J*, 34: 217–228.
- Glazebrook J, Rogers EE, Ausubel FM.** (1996) Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics*, 143: 973–982.

- Göbel C, Feussner I, Rosahl S.** (2003) Lipid peroxidation during the hypersensitive response in potato in the absence of b-lipoxygenases. *J Biol Chem*, 278: 52834-52840
- Goodman R, Novacky A.** (1994) The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens: A Resistance Phenomenon. APS Press, St Paul, MN, USA, 244 pp.
- Granado J, Felix C, Boller T.** (1995) Perception of fungal sterols in plants. *Plant Physiol*, 107: 485-490.
- Grant M, Lamb C.** (2006) Systemic immunity. *Curr Opin Plant Biol*, 9: 414-420
- Grayer RJ, Harborne JB.** (1994) A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982–1993. *Phytochemistry*, 37: 19–42.
- Greenberg JT.** (2000) Positive and negative regulation of salicylic acid-dependent cell death and pathogen resistance in *Arabidopsis lsd6* and *ssi1* mutants. *Mol Plant Microbe Interact*, 13: 877-881.
- Grover A, Gowthaman R.** (2003) Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. *Curr Sci*, 84:330–340.
- Guérin L, Benhamou N, Rouxel F.** (1998) Ultrastructural and cytochemical investigations of pathogen development and host reactions in susceptible and partially-resistant carrot roots infected by *Pythium violae*, the major causal agent for cavity spot. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 653–665.,
- Hahn MG.** (1996) Microbial elicitors and their receptors in plants. *Ann. Rev. Phytopathol*, 34: 387-412.
- Hammerschmidt R.** (1999) Phytoalexins: what have we learned after 60 years? *Annu.Rev. Phytopathol*, 37: 285–306.
- Hammerschmidt R, Kuc J.** (1995) Induced Resistance to Disease in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 182.
- Hammerschmidt R, Nicholson RL.** (1999) A survey of plant defense responses to pathogens. In: *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores* (eds A.A. Agrawal & S. Tuzun), pp. 55–71, APS Press, St. Paul, USA.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG.** (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8: 1773–1791.
- Harborne JB.** (1989) Higher plantlower plant interactions: phytoalexins and phytotoxins. In: Harborne JB, editor. *Introduction to ecological Biochemistry*. U.K: Academic Press; p. 302-40.
- Harborne JB.** (1991) Role of secondary metabolites in chemical defence mechanisms in plants. In: *Bioactive Compounds from Plants*. (D.J. Chadwick,, J. Marsh, ed.), John Wiley and Sons, Chichester, UK, 126–139.
- Hargreaves JA, Bailey JA.** (1978) Phytoalexin production by hypocotyls of *Phaseolus vulgaris* in response to constitutive metabolites released by damaged bean cells. *Physiol. Plant Pathol*, 13: 89-100.
- Hawes MC, Gunawardena U, Miyasaka S, Zhao X.** (2000) The role of root border cells in plant defense. *Trends Plant Sci*, 5: 128–133.

- Heath MC.** (1998) Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *Eur. J. Plant Pathol*, 104: 117-124.
- Heath MC.** (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol*, 44: 321-334.
- Heck S, Grau T, Buchala A, Métraux J-P, Nawrath C.** (2003) Genetic evidence that expression of NahG modifies defence pathways independent of salicylic acid biosynthesis in the *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* pv. *tomato* interaction. *Plant J*, 36: 342-352.
- Henriquez MA, Adam LR, Daayf F.** (2012) Alteration of secondary metabolites' profiles in potato leaves in response to weakly and highly aggressive isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol. Biochem*, 57: 8-14.
- Herrmann K, Weaver LM.** (1999) The shikimate pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio*, 50: 473-503.
- Hipskind JD, Hanau R, Leite B, Nicholson RL.** (1990) Phytoalexin accumulation in sorghum, identification of an apigeninidin acyl ester. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 36: 381–396.
- Höfte M, Bakker PAHM.** (2007) Competition for iron and induced systemic resistance by siderophores of plant growth promoting rhizobacteria. In *Soil biology: Microbial siderophores*. Varma, A., and Chincholkar, S.B. (ed.) Heidelberg, Germany: Springer-Verlag Berlin, pp. 121-133.
- Huckelhoven R.** (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol*, 45: 101-27.
- Hunt MD, Ryals JA.** (1996) Systemic acquired resistance signal transduction. *Crit Rev Plant Sci*, 15: 583-606.
- Idnurm A, Howlett BJ.** (2001) Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology*, 2: 241-255.
- Ikegawa T, Mayama S, Nakayashiki H, Kato H.** (1996) Accumulation of diferulic acid during the hypersensitive response of oat leaves to *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* and its role in the resistance of oat tissues to cell wall degrading enzymes. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 48: 245–256.
- Jabs T, Dietrich RA, Dangl JL.** (1996) Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science*, 273: 1853–1856.
- Jaiti F, Dihazi A, El Hasni M, EL Hadrami A, EL Hadrami I.** (2004) Effect of exogenous application of jasmonic acid on date palm defense reaction against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Phytopathol Mediterr*, 43:325-331.
- Jaiti F, Meddich A, Kassami M, El Hadrami I.** (2008) Effect of Arbuscular Mycorrhization on the accumulation of hydroxycinnamic acid derivatives in date palm seedlings challenged with *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. *J. Phytopathol*, 156: 641-646.
- Jaiti F, Verdeil JL, El Hadrami I.** (2009) Effect of jasmonic acid on the induction of polyphenoloxidase and peroxidase activities in relation to date palm resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 74: 84–90,

- Jayasuja V, Iyer R.** (2003) Multiplication and translocations of introduced endophytic antagonistic bacterium (*Bacillus amyloliquefaciens*) in coconut seedlings, 6th Intl. PGPR worshop, Calicut, India, pp. 33-37.
- Jones JDG, Dangl JL.** (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Johnson C, Boden E, Arias J.** (2003) Salicylic Acid and NPR1 Induce the Recruitment of trans-Activating TGA Factors to a Defense Gene Promoter in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15: 1846-1858.
- Joy A, Parke J.** (1994) Biocontrol of *Alternaria* leaf blight on American ginseng by *Burkholderia cepacia* AMMD, in: Bailey WG, Whitehead C, Procter JTA, Kyle JT (Eds), Challenges of the 21st century, Proceedings of the International Ginseng Conference, Vancouver, British Columbia, Canada, Burnaby, B.C., Canada, Simon Fraser Univ.
- Kato M, Shimizu S.** (1987) Chlorophyll metabolism in higher plants VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves; phenolic-dependent peroxidative degradation. *Can. J. Bot*, 65: 729-735.
- Kaufmann S, Dorey S, Fritig B.** (1999) Les stratégies de défenses des plantes. *Pour la Science*, 262: 30-37.
- Kauss H, Theisinger-Hinkel E, Mindermann R, Conrath U.** (1992) Dichloroisonicotinic and salicylic acid, inducers of systemic acquired resistance, enhance fungal elicitor responses in parsley cells. *Plant Journal*, 2: 655–660.
- Kauss H, Jeblick W.** (1995) Pretreatment of parsley suspension cultures with salicylic acid enhances spontaneous and elicited production of H₂O₂. *Plant Physiol*, 108: 1171–1178.
- Kawasaki T, Koita H, Nakatsubo T, Hasegawa K, Wakabayashi K, Takahashi H, Umemura K, Umezawa T, Shimamoto K.** (2006) Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:230-235.
- Kawchuk LM, Hachey J, Lynch DR, Kulcsar F, Van Rooijen G, Waterer DR, Robertson A, Kokko E, Byers R, Howard RJ, Fischer R, Prufer D.** (2001) Tomato *Ve* disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 6511-6515.
- Keen NT, Dawson WO.** (1992) Pathogen avirulence genes and elicitors of plant defense. In Plant gene research, genes involved in plant defense, Boller T and Meins F (eds). Wien: Springer Verlag, pp 85-114.
- Kilani-Feki O, Jaoua S.** (2011) Biological control of *Botrytis cinerea* using the antagonistic and endophytic *Burkholderia cepacia* Cs5 for vine plantlet protection. *Can. J. Microbiol*, 57 : 896–901.
- Kelani-Feki O, Culoli G, Ortalo-Magné A, Zouari N, Blache Y, Jaoua S.** (2011) Environmental *Burkholderia cepacia* Cs5 acting by two analogous alkyl-quinolones and a didecyl-phtalate against a broad spectrum of phytopathogens fungi. *Curr Microbiol*, 62: 1490-1495.
- Kessmann H, Staub T, Hofmann C, Maetzke T, Herzog J.** (1994) Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Ann. Rev. Phytopathol*, 32: 439–459.

- Kinkema M, Fan W, Dong X.** (2000) Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell*, 12: 2339–2350.
- Klopper JW, Ryu CM, Zhang SA.** (2004) Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathol*. 94: 1259-1266.
- Kogel KH, Beckhove U, Dreschers J, Munch S, Romme Y.** (1994) Acquired resistance in barley. *Plant Physiol*, 106: 1269–1277.
- Koornneef A, Pieterse CMJ.** (2008) Cross-talk in defense signaling. *Plant Physiol*, 146: 839–844.
- Kombrink E, Somssich IE.** (1997) Pathogenesis-related proteins and plant defense. *Plant relationships*, 107-128.
- Koulla L, Saaidi M.** (1985) Etude du rôle des inflorescences et de fruits du palmier dattier dans la dissémination du Bayoud. Séminaire National sur l'Agronomie Saharienne, pp. 67-70. INRA, Marrakech, Morocco.
- Kröner A, Marnet N, Andrivon D, Val F.** (2012) Nicotiflorin, rutin and chlorogenic acid: phenylpropanoids involved differently in quantitative resistance of potato tubers to biotrophic and necrotrophic pathogens. *Plant Physiol. Biochem*, 57: 23-31
- Kunkel BN, Brooks DM.** (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Op. Plant Biol*, 5: 325–331.
- Lamb C, Dixon RA.** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 48: 251-275.
- Langcake P, Pryce RJ.** (1976) Production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol*, 9: 77–86.
- Lavania M, Chauhan PS, Chauhan SVS, Singh HB, Nautiyal CS.** (2006) Induction of plant defence enzymes and phenolics by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria *Serratia marcescens* NBRI1213. *Curr. Microbiol*, 52: 363–368.
- Lawton K, Friedrich L, Hunt M, Weymann K, Staub T, Kessmann H, Ryals J.** (1996) Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant Journal*, 10: 71–82.
- Leach JE, White FF.** (1996) Bacterial avirulence gene. *Annu. Rev. Phytopathol*, 34 :153-179.
- Lee HI, Leon J, Raskin I.** (1995) Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 4076–4079.
- Lee SC, Hwang BK.** (2005) Induction of some defense-related genes and oxidative burst is required for the establishment of systemic acquired resistance in *Capsicum annuum*. *Planta*, 221: 790-800.
- Leon J, Shulaev V, Yalpani N, Lawton MA, Raskin I.** (1995) Benzoic acid 2-hydroxylase, a soluble oxygenase from tobacco, catalyzes salicylic acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10413–10417

- Lepoivre P.** (2003) Phytopathologie: bases moléculaires de biologiques des pathsystems et fondement des stratégies de lutte. De Boeck & Presses Agronomiques de Gembloux (Eds.), Brussels, Belgium, 149-167.
- Levine A, Pennell RI, Alvarez ME, Palmer R, Lamb C.** (1996) Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79: 583-593.
- Li X, Zhang Y, Clark JD, Li Y, Dong X.** (1999) Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, SNI, through a screen for suppressors of *npr1-1*. *Cell*, 98: 329–339.
- Liu Y, Ren D, Pike S, Pallardy S, Gassmann W, Zhang S.** (2007) Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *Plant J*, 51 : 941-954.
- Loake G, Grant M.** (2007) Salicylic acid in plant defence--the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol*, 10: 466-472.
- Lorrain S, Lin B, Auriac MC, Kroj T, Saindrenan P, Nicole M, Balagué C, Roby D.** (2004) vascular associated death1, a novel GRAM domain-containing protein, is a regulator of cell death and defense responses in vascular tissues. *Plant Cell*, 16: 2217-2232.
- Lorrain S, Vailleau F, Balagué C, Roby D.** (2003) Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci*, 8 : 263-271.
- Lo S-C, de Verdier K, Nicholson RL.** (1999) Accumulation of 3-deoxyanthocyanidin phytoalexins and resistance to *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 55: 263–273.
- Lotfi F. (1997)** Contribution à l'étude phytotoxique et biochimique des toxins peptidiques sécrétés par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal de la fusariose vasculaire du palmier dattier (Bayoud). Thèse de 3^{ème} cycle. Faculté des Sciences Semlalia ; Marrakech.
- Louvet J.** (1977) Observations sur la localisation des chlamydospores de *Fusarium oxysporum* dans les tissus des plantes parasitées. Travaux Dédiés à G. Viennot Bourgin, pp. 193-197. INRA, Paris, France.
- Louvet J, Bulit J, Toutain G, Rieuf P.** (1970) Le Bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier, symptômes et nature de la maladie, moyens de lutte. *Al-Awamia*, 35 : 161-182.
- Louvet J, Toutain G.** (1973) Recherches sur les fusarioses. VIII-Nouvelles observations sur la fusariose du palmier dattier et précisions concernant la lutte. *Ann Phytopathol*, 5:35-52.
- Madhusudhan KN, Srikanta BM, Shylaja MD, Prakash HS, Shetty HS.** (2009) Changes in antioxidant enzymes, hydrogen peroxide, salicylic acid and oxidative stress in compatible and incompatible host-tobamovirus interaction. *J Plant Inter*, 4: 157-166
- Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I.** (1990) Salicylic acid a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 250: 1002-1004.
- Malamy J, Klessig D.** (1992) Salicylic acid and plant defense resistance. *Plant J*, 2: 643–654

- Mandal S, Das RK, Mishra S.** (2011) Differential occurrence of oxidative burst and antioxidative mechanism in compatible and incompatible interactions of *Solanum lycopersicum* and *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiol Biochem*, 49: 117-123
- Mandal S, Mallick N, Mitra A.** (2009) Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiol Biochem*, 47: 642-649.
- Mansfield JW.** (2000) Antimicrobial compounds and resistance: the role of phytoalexins and phytoanticipins. In *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*, A. Slusarenko, R.S.S. Fraser and L.C. van Loon, eds (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands), pp. 325–370.
- Martinez C, Montillet JL, Bresson E, Agnel JP, Dai GH, Daniel JF, Geiger JP, Nicole M.** (1998) Apoplastic Peroxidase Generates Superoxide Anions in Cells of Cotton Cotyledons Undergoing the Hypersensitive Reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* Race 18. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 11 : 1038-1047.
- Martoja R, Martoja M.** (1967) Réactions basées sur une oxydation suivie d'une mise en évidence des carbonyles formés. In *Initiations aux Techniques de l'Histologie Animale*, pp. 154–162, Masson et Cie, Paris, France.,
- Maslouhy A.** (1989) Contribution à l'étude in vitro et in situ des antagonistes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal du Bayoud. Marrakech: Diplôme des Etudes Supérieures, Université Cadi Ayyad.
- Masuta C, Van den Bulcke M, Bauw G, Van Montagu M, Caplan AB.** (1991) Differential Effects of Elicitors on the Viability of Rice Suspension Cells. *Plant Physiol*, 97: 619-629.
- Matern U, Grimmig B.** (1993) Polyphenols in plant pathology. In: *Polyphenolic Phenomena* (A. Scalbert, ed.), INRA Editions, Paris, France, 143–147.
- Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T.** (1988) Antifungal hydrolases in pea. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiol*, 88: 936 – 942.
- Mauch F, Mauch-Mani B, Gaille C, Kull B, Haas D, Reimann C.** (2001) Manipulation of salicylate content in *Arabidopsis thaliana* by the expression of an engineered bacterial salicylate synthase. *Plant J*, 25: 67–77.
- May MJ, Parker JE, Daniels MJ, Leaver CJ, Christopher S.** (1996) An *Arabidopsis* mutant depleted in glutathione shows unaltered responses to fungal and bacterial pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact*, 9: 349–356.
- McDonald BA.** (2004) Population Genetics of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-A-0524-01.
- McDowell JM.** (2004) Convergent evolution of disease resistance genes. *Trends Plant Sc*, 9: 315–317.
- McNally DJ, Wurms KV, Labbé C, Bélanger RR.** (2003) Synthesis of C-glycosyl flavonoid phytoalexins as a site-specific response to fungal penetration in cucumber. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 63: 293–303.

- Mehdy MC.** (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol*, 105: 467–472.
- Mercado-Blanco J, Bakker PAHM.** (2007) Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92: 367-389.
- Métraux JP, Raskin I.** (1993) Role of phenolics in plant disease resistance. In: *Biotechnology in Plant Disease Control*. Wiley-Liss Inc., New York, NY, USA 191–209.
- Métraux JP, Signer H, Ryals J, Ward E, Wyss-Benz M, Gaudin J, Raschdorf K, Schmid E, Blum W, Inverardi B.** (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*, 250: 1004-1006.
- Meyers BC, Kaushik S, Nandety RS.** (2005) Evolving disease resistance genes. *Curr. Opin. Plant Biol*, 8: 129–134.
- Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang H, Michelmore RW.** (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15: 809–834.
- Meyer JM, Tran V, Stinzi A, Berge O, Winkelmann G.** (1995) Ornibactin production and transport properties in strains of *Burkholderia cepacia* and *Burkholderia vietnamiensis* (formely *Pseudomonas cepacia*). *Biometal*, 8: 309-307.
- Mikolajczyk M, Awotunde OS, Muszynska G, et al.** (2000) Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cell. *Plant Cell*, 12: 165–178.
- Miranda M, Ralph SG, Mellway R, White R, Heath MC, Bohlmann J, Constabel CP.** (2007) The transcriptional response of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*) to infection by *Melampsora medusae* leaf rust involves induction of flavonoid pathway genes leading to the accumulation of proanthocyanidins. *Mol. Plant Microbe Interact*, 20: 816-831.
- Mittler R.** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 7: 405-410.
- Mittler R, Herr EH, Orvar BL, Van Camp W, Willekens H, et al.** (1999) Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 14165-14170.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F.** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci*, 9: 490-498.
- Mokhlisse-Dunad N.** (1987) Le Bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier. Contribution à l'identification et à l'étude de la toxicité des différents constituants de la toxine secrétée par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Marrakech: Diplôme des Etudes Supérieures, Université Cadi Ayyad.
- Montesano M, Brader G, Palva ET.** (2003) Pathogen driven elicitor: searching for receptors in plants. *Mol Plant Pathol*, 4: 73-79.
- Mou Z, Fan W, Dong X.** (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113: 935-944.

- M'Piga P, Belanger RR, Paulitz TC, Benhamou N.** (1997) Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28, *Physiol. Mol. Plant. Pathol.*, 50: 301–320.
- Nash SS.** (1978) Comparison of germination of pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* chlamydospores in host rhizosphere soils conductive and suppressive to wilts. *Phytopathol.*, 67: 502-10.
- Neu R.** (1957) A new reagent for differentiating and determining flavones on paper chromatograms. *Naturwissenschaften*, vol. 43, p. 82.
- Neuenschwander U, Vernooij B, Friedrich L, Uknes S, Kessmann H, Ryals J.** (1995) 1s hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J.*, 8: 227-233.
- Nicholson RL, Hammerschmidt R.** (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 30: 369–389.
- Nicholson RL, Kollipara SS, Vincent JR, Lyons PC, Cadena-Gomez G.** (1987) Phytoalexin synthesis by the sorghum mesocotyl in response to infection by pathogenic and nonpathogenic fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 5520–5524.
- Niderman T, Genetet I, Bruyere T, Gees R, Stintzi A, Legrand M, Fntig B, Mosinger E.** (1995) Pathogenesis-related PR- 1 proteins are antifungd. 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 Physiol.*, 108 : 17-27.
- Nielsen KA, Gottfredsen CH, Buch-Pedersen MJ, Ammitzboll H, Mattsson O, Duus JO, Nicholson RL.** (2004) Anti-microbial flavonoid 3 deoxyanthocyanidins in Sorghum bicolor self-organize into spherical structures. *Physiol Mol Plant Pathol.*, 65: 187-196
- Niemann GJ, Van Der Kerv A, Niessen WMA, Versluis K.** (1991) Free and cell wall-bound phenolics and other constituents from healthy and fungus-infected carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) stems. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 38: 417–432.
- Nimchuk Z, Eulgem T, Holt III BF, Dangl JL.** (2003) Recognition and response in the plant immune system. *Annu. Rev. Genet.*, 37: 579–609.
- Nürnberg T, Lipka V.** (2005) Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol. Plant Pathol.*, 6: 335–345.
- Nürnberg T.** (1999) Signal perception in plant pathogen defence. *Cellular and Molecular Life Science*, 55: 167-182.
- Nürnberg T, Brunner F.** (2002) Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5: 318–324.
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L.** (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.*, 198: 249–266.

- Oihabi A, Hatimi A, Amir H.** (1992) Etude de la réceptivité au Bayoud de deux sols de palmeraies marocaines. *Phytopath Medit*, 31: 19-27.
- Oihabi A.** (1984) Etude du comportement vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* de jeunes plants de palmier dattier. Thèse de troisième cycle. Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc.
- Ongena M, Thonart P.** (2006) Resistance induced in plants by non-pathogenic microorganisms: elicitation and defense responses. In *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues (1st edition)*. Teixeira da Silva, J.A. (ed.) Japan: Global Science Books, pp. 447-463.
- Panina YS, Gerasimova NG, Chalenko GI, Vasyukova NI, Ozeretskovskaya OL.** (2004) Salicylic Acid and Phenylalanine Ammonia-Lyase in Potato Plants Infected with the Causal Agent of Late Blight. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52: 511–515.
- Parker JE.** (2003) Plant recognition of microbial patterns. *Trends Plant Sci*, 8: 245–247.
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C.** (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24: 255–265.
- Patel M, Kothari IL, Mohan JS.** (2004) Plant defense induced in *in vitro* propagated banana (*Musa paradisiaca*) plantlets by Fusarium derived elicitors. *Indian J Exp Biol*, 42: 728-731.
- Paxton JD.** (1981) Phytoalexins – a working redefinition. *Phytopathol*. 101: 106–109.
- Pellinen RI, Korhonen MS, Tauriainen AA, Palva ET, Kangasjärvi J.** (2002) Hydrogen Peroxide Activates Cell Death and Defense Gene Expression in Birch. *Plant Physiol*, 130: 549-560.
- Peng M, Kuc J.** (1992) Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathol*, 82: 696–699.
- Pereau-Leroy P.** (1954) Variétés de dattiers résistantes à la fusariose. *Fruits*, 9: 450-451.
- Pérez-de-Luque A, González-Verdejo CI, Lozano MD, et al.** (2006) Protein cross-linking, peroxidase and β -1,3-endoglucanase involved in resistance of pea against *Orobanche crenata*,” *J. Exp. Bot*, 6: 1461–1469.
- Pérez-de-Luque A, Rubiales D, Cubero JI, et al.** (2005) Interaction between *Orobanche crenata* and its host legumes: unsuccessful haustorial penetration and necrosis of the developing parasite. *Annals of Botany*, 95: 935–942.
- Pieterse CMJ, Ton J, van loon LC.** (2001) Cross-talk between plant defenses signaling pathways: boost or burden. *Ag. Biotech.Net*, 3: 1- 8.
- Pieterse CMJ, Van Loon LC.** (1999) Salicylic acid independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science*, 4: 52–58.
- Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Ton J, Van Pelt JA, Van Loon LC.** (2002) Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol*, 4: 535-544.

- Pieterse CMJ, Van Wees SCM, van Pelt JA, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek PJ, van Loon LC.** (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10:1571–1580.
- Pomar F, Novo M, Bernal MA, Merino F, RosBarcelo A.** (2004) Changes in stem lignins (monomer composition and crosslinking) and peroxidase are related with the maintenance of leaf photosynthetic integrity during *Verticillium* wilt in *Capsicum annuum*. *New Phytologist*, 163: 111–123.
- Rahmania F.** (1982) Contribution à la connaissance du palmier dattier, *Phoenix dactylifera* L et de l'agent du Bayoud, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Killian et Maire) Gordon. Aspects ultrastructuraux des relations hôte-parasite. Thèse de troisième cycle, université Houari Boumediene, Alger.
- Ramos T, Bellaj M, El Idrissi-Tourane A, Daayf F, El Hadrami I.** (1997) Les phénolamides des rachis de palmes, composants de la réaction de défense du palmier dattier vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal du Bayoud. *J Phytopathol*, 145: 487-93.
- Raskin I.** (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43: 439-463.
- Rauscher M, Ádám AL, Wirtz S, Guggenheim R, Mendgen K, Deising HB.** (1999) PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. *Plant J*, 19: 625-633.
- Reddy M.** (1997) Status on commercial development of *Burkholderia cepacia* for biological control of fungal pathogens and growth enhancement of conifer seedlings for a global market, Washington, US Forest service general technical report PNW, Report no 389, pp. 235-44.
- Rhouma A.** (1996) Le palmier dattier en Tunisie: un secteur en plein expansion. *Option Méditerranéens*, Série A, Séminaires Méditerranéens, 28:85-104.
- Ricci P, Bonnet P, Huet JC, Sallantin M, Bauvais-cante F, Bruneteau M, Billard V, Michel G, Pernollet JC.** (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur. J. Biochem*, 183: 555-563.
- Robatzek S, Chinchilla D, Boller T.** (2006) Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 20: 537–542.
- Rohini VK, Rao KS.** (2000) Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.): a non-tissue culture based approach for generating transgenic plants. *Plant Sci*, 150:41-49.
- Rossard S, Luini E, Péralt JM, Bonmort J, Roblin G.** (2006) Early changes in membrane permeability, production of oxidative burst and modification of PAL activity induced by ergosterol in cotyledons of *Mimosa pudica*. *J Exp Bot*, 57: 1245-1252
- Ruegger M, Chapple C.** (2001) Mutations that reduce sinapoylmalate accumulation in *Arabidopsis thaliana* define loci with diverse roles in phenylpropanoid metabolism. *Genetics*, 159: 1741–1749.

- Rüffer M, Steipe B, Zenk MH.** (1995) Evidence against specific binding of salicylic acid to plant catalase. FEBS Letters, 377:175–180.
- Rustérucci C, Stallaert V, Milat ML, Pugin A, Ricci P, Blein JP.** (1996) Relationship between active oxygen species, lipide peroxidation, necrosis and phytoalexin production induced by elicitors in Nicotiana. Plant Physiol, 111: 885-891
- Ryals J, Weymann K, Lawton K, Friedrich L, Ellis D, et al.** (1997) The Arabidopsis *NIM1* protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor IB. Plant Cell, 9: 425–439.
- Ryerson DE, Heath MC.** (1996) Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. Plant Cell, 8: 393–402.
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Kloepffer JW, Pare PW.** (2004) Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. Plant Physiol, 134: 1017–1026.
- Ryu CM, Hu CH, Reddy MS, Kloepffer JW.** (2003) Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. New Phyto, 160: 413-420.
- Saaidi M.** (1979) Contribution à la lutte contre le Bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier. Thesis, University of Dijon, France.
- Saaidi M.** (1992) Comportement au champ de 32 cultivars de palmier dattier vis à vis du Bayoud: 25 années d'observations. Agronomie, 12:359-70.
- Salzman RA, Tikhonova I, Bordelon BP, Hasegawa PM, Bressan RA.** (1998) Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. Plant Physiol, 117:465-472.
- Sasaki K, Iwai T, Hiraga S, et al.** (2004) Ten rice peroxidases redundantly respond to multiple stresses including infection with rice blast fungus. Plant and Cell Physiol, 45: 1442–1452.
- Scandalios JG.** (1993) Oxygen stress and Superoxide Dismutase. Plant Physiol, 101: 7-12.
- Schenk PM, Kazan Wilson KI, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM.** (2000) Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. Proc Natl Acad Sci USA, 97:11655–11660.
- Scherer NM, Thompson CE, Freitas LB, Bonatto SL, Salzano FM.** (2005) Patterns of molecular evolution in pathogenesis related proteins. Genetics and Molecular Biology, 28: 645–653.
- Schröder J, Schröder G.** (1990) Stilbene and chalcone synthases: related enzymes with key functions in plant-specific pathways. Z. Naturforsch, 45: 1-8.
- Sedra MH, Rouxel F.** (1989) Résistance des sols aux maladies. Mise en évidence de la résistance d'un sol de la palmeraie de Marrakech aux fusarioses vasculaires. Al Awamia, 66: 35-54.
- Sergeiv I, Alexieva V, Karanov E.** (1997) Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. Compt. Rend. Acad Bulg Sci, 51.

- Serghini K, Pérez de Luque A, Castejon-Munoz M, Garcia-Torres L, Jorrin JV.** (2001) Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (*Orobanche cernua* Loefl.) parasitism: induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins. *J. Exp. Bot.* 52: 2227–2234.
- Shah J.** (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Op. Plant Biol.* 6: 365–371.
- Shah J, Tsui F, Klessig DF.** (1997) Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sai1*) of *Arabidopsis thaliana* identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. *Mol. Plant–Microbe Interac.*, 10: 69–78.
- Shimzu N, Hosogi N, Hyon GS, Jiang S, Inoue K, Park P.** (2006) Reactive oxygen species (ROS) generation and ROS induced lipid peroxidation are associated with plant membrane modifications in host cells in response to AK-toxin from *Alternaria alternate* Japanese pear pathotype. *J. Gen Plant Pathol*, 72: 6-15
- Shirasu K, Schulze-Lefert P.** (2003) Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease-resistance pathways. *Trends Plant Sci*, 8: 252-258.
- Simmons CR.** (1994) The physiology and molecular biology of plant 1,3-D-glucanases and 1,3-1,4-D-glucanases. *Crit. Rev. Plant Sci*, 13: 325-87.
- Snyder BA, Leite B, Hipskind J, Butler LG, Nicholson RL.** (1991) Accumulation of sorghum phytoalexins induced by *Colletotrichum graminicola* at the infection site. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 39: 463–470.
- Snyder BA, Nicholson RL.** (1990) Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site specific response to fungal ingress. *Science*, 248: 1637–1639.
- Sobolev VS, Cole RJ, Dorner JW, Yagen B.** (1995) Isolation, purification, and liquid chromatographic determination of stilbene phytoalexins in peanuts. *J. AOAC Int*, 78: 1177–1182.
- Souna F, Chafi A, Chakroune K, Himri I, Bouakka M, Hakkou A.** (2010) Effect of Mycorrhization and Compost on the Growth and the Protection of Date Palm (*Phoenix Dactylifera L.*) Against Bayoud Disease. *Am.-Eurasian J. Sust. Agri*, 4: 260-267.
- Soylu S.** (2006) Accumulation of cell-wall bound phenolic compounds and phytoalexin in *Arabidopsis thaliana* leaves following inoculation with pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Plant Science*, 170: 942–952
- Soylu S, Brown I, Mansfield JW.** (2005) Cellular reactions in *Arabidopsis* following challenge by strains of *Pseudomonas syringae*: from basal resistance to compatibility. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 66: 232-243
- Spoel SH, Dong X.** (2008) Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host Microbe*, 3: 348–351.
- Spoel SH, Johnson JS, Dong X.** (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 18842-18847.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Metraux J, Brown R, Kazan K, et al.** (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and

- jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell*, 15: 760–770.
- Spurr AR.** (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electronmicroscopy," *Journal of Ultrastructure Research*, 26: 31–43.
- Sreenivasulu N, Grimin B, Wobus U, Weschke W.** (2000) Differential response of antioxidant compounds to salinity-stress in salt tolerant and salt sensitive seedling of foxtail millet (*Setaria italica*). *Physiol Plant*, 109: 435-442.
- Staskawicz BJ, Dahlbeck D, Keen NT.** (1984) Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea* determines race-specific incompatibility on glycine max (L.) Merr. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 6024-6028.
- Stergiopoulos I, de Wit PJ.** (2009) Fungal effector proteins. *Ann. Rev. Phytopathol*, 47: 233-263.
- Takken FL, Joosten MHAJ.** (2000) Plant resistance genes: Their structure, function and evolution. *Eur. J. Plant Pathol*, 106: 699-713.
- Tang XY, Frederick RD, Zhou JM, Halterman DA, Jia YL, Martin GB.** (1996) Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science*, 274: 2060–2063.
- Tantaoui A.** (1989) Contribution à l'étude de l'écologie du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* agent causal du Bayoud. Densité et répartition de l'inoculum au sein du peuplement fusarien. D.E.S., University Cadi Ayyad, Marrakech, Morocco.
- Tantaoui A, Boisson C.** (1991) Compatibilité végétative d'isolats du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et des *Fusarium oxysporum* de la rhizosphère du palmier dattier et des sols de palmeraies. *Phytopath Medit*, 30: 155-63.
- Tantaoui A, Ouinten M, Geiger JP, Fernandez D.** (1996) Characterization of a single clonage lineage of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* causing Bayoud disease of date palm in Morroco. *Phytopathol*, 86: 787-92.
- Thoma I, Loeffler C, Sinha AK, Gupta M, Krischke M, Steffan B, Roitsch T, Mueller MJ.** (2003) Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J*, 34: 363-375
- Thomma BP, Penninckx IA, Broekaert WF, Cammue BP.** (2001) The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Immunol*, 13: 63-68.
- Thompson JN, Burdon JJ.** (1992) Gene-for-gene coevolution between plants and parasites. *Nature*, 360: 121-125.
- Torres MA, Dangl JL.** (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol*, 8: 397-403.
- Torres MA, Dangl JL, Jones JDG.** (2002) *Arabidopsis gp91phox* homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 517–522.

- Torres MA, Jones JD, Dangl JL.** (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol*, 141:373–78.
- Torres-Zabala M, Truman W, Bennett MH, Lafforgue G, Mansfield JW, Rodriguez EP, et al.** (2007) *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO J*, 26:1434–43.
- Toutain G, Louvet J. (1974)** Lutte contre le Bayoud. IV. Orientations de la lutte au Maroc. AlAwamia, 53: 114-162.
- Treutter D.** (2005) Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology*, 7: 581–591.
- Treutter D.** (2006) Significance of flavonoids in plant resistance, a review. *Env. Chemistry Letters*, 4: 147–157.
- Tropf S, Lanz T, Rensing SA, Schröder J, Schröder G.** (1994) Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution. *J. Mol. Evol*, 38: 610-618.
- Trujillo M, Kogel KH, Huckelhoven R.** (2004) Superoxide and hydrogen peroxide play different roles in the nonhost interaction of barley and wheat with inappropriate formae speciales of *Blumeria graminis*. *Mol Plant Microbe Interact*, 17: 304-312.
- Umamaheswari C, Sankaralingam A., Nallathambi P.** (2009) Induced systemic resistance in watermelon by biocontrol agents against *Alternaria alternate*. *Archives Phytopathol. Pl. Prot*, 42: 1187–1195.
- Uppalapati SR, Ishiga Y, Wangdi T, Kunkel BN, Anand A, Mysore KS, Bender CL.** (2007) The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol Plant Microbe Interact*, 20: 955-965.
- Valette C, Andary C, Geiger JP, Sarah JL, Nicole M.** (1998) Histochemical and cytochemical investigations of phenols in roots of banana infected by the burrowing nematode *Radopholus similis*,” *Phytopathol*, 88: 1141–1148.
- Van Breusegem F, Dat JF.** (2006) Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol*, 141: 384-39.
- Vandenabeele S, Vanderauwera S, Vuylsteke M, Rombauts S, Langebartels C, Seidlitz HK, Zabeau M, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F.** (2004) Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 39: 45-58.
- VanEtten HD, Mansfield JW, Bailey JA, Farmer EE.** (1994) Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus ‘phytoanticipins’. *Plant Cell*, 6: 1191–1192.
- Van Kan JAL, Coijnsen T, Danhash N, De Wit PJGM.** (1995) Induction of tomato stress protein mRNAs by ethephon, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylate. *Plant Molecular Biology*, 27: 1205–1213.

- Van Loon LC, Bakker PAHM.** (2005) Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In *PGPR: biocontrol and biofertilization*. Siddiqui, Z.A. (ed.) Dordrecht, The Netherlands: Springer Science, pp. 39-66.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CM.** (2006) Significance of inducible defenserelated proteins in infected plants. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 44:135-162.
- Van Loon LC, Van Kammen A.** (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. ‘Samsun’ and ‘Samsun NN’. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40: 199-211.
- Vasyukova NI, Gerasimova NG, Ozeretskovskaya OL.** (1999) *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 35: 557–563.
- Vasyukova NI, Ozeretskovskaya OL.** (2007) Induced Plant Resistance and Salicylic Acid: A Review. *App. Biochem. Microbiol.*, 43: 367–373.
- Velikova V, Yordanov I, Edreva A.** (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.*, 151: 151-166
- Verberne MC, Verpoorte R, Bol JF, Mercado-Blanco J, Linthorst HJM.** (2000) Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nat. Biotechnol.*, 18: 779–783.
- Vernooij B, Friedrich L, Morse A, Reist R, Kolditz-Jawhar R, Ward E, Uknes S, Kessmann H, Ryals J.** (1994) Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell*, 6: 959-965.
- Vicré M, Santaella C, Blanchet S, Gateau A, Driouch A.** (2005) Root border-like cells of Arabidopsis: microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria. *Plant Physiol.*, 138: 998–1008.
- Walker JC.** (1925) Studies on disease resistance in the onion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 11: 183–189.
- Walker JC, Link PK, Angell HR.** (1929) Chemical aspects of disease resistance in the onion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 15: 845–850.
- Walton JD.** (1994) Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol.*, 104: 1113-1118.
- Wang D, Weaver ND, Kesarwani M, Dong X.** (2005) Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science*, 308: 1036–1040.
- Wang X, El Hadrami A, Adam LR, Daayf F,** (2008) Differential activation and suppression of potato defence responses by *Phytophthora infestans* isolates representing US-1 and US-8 genotypes. *Plant Pathol.*, 57: 1026-1037.
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexer DC, Ahl-Goy P, Métraux JP, Ryals JA.** (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 3:1085-1094.

Ward EWB. (1986) Biochemical mechanisms involved in resistance of plants to fungi," in *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions*, J. A. Baily, Ed., pp. 107–131, Springer-K.G., Berlin, Germany.

Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM. (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414: 562-565.

Willats WGT, McCartney L, Knox JP. (2001) In-situ analysis of pectic polysaccharides in seed mucilage and at the root surface of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 213: 37–44

Wojtaszek P. (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J*, 322: 681- 692.

Wu G, Shortt BJ, Lawrence EB, Elaine EB, Fitzsimmons KC, Shah DM. (1995) Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell*, 7: 1357-1368.

Xiao S, Ellwood S, Calis O, Patrick E, Li T, Coleman M, Turner JG. (2001) Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by *RPW8*. *Science*, 291: 118-120.

Yalpani N, Leon J, Lawton MA, Raskin I. (1993) Pathway of salicylic-acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol*, 103: 315–321.

Yalpani N, Silverman P, Wilson TMA, Kleier DA, Raskin I. (1991) Salicylic Acid is a Systemic Signal and an Inducer of Pathogenesis-Related Proteins in Virus-Infected Tobacco. *Plant Cell*, 3: 809-818

Yan Z, Reddy MS, Ryu C-M, McInroy JA, Wilson M, Kloepper JW. (2002) Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathol*, 92: 1329–1333.

Zaid A. (2003) Date palm culture in the UAE: Situation and Future Challenge.Zayed Centre for Coordination and Follow-up, Abu Dhabi, 1-26.

Zhang S, Du H, Klessig DF. (1998) Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell*, 3: 435–450.

Zhang Y, Fan W, Kinkema M, Li X, Dong X. (1999) Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 6523–6528.

Ziouti A. (1998) Aspects biochimiques de l'interaction *Phoenix dactylifera* L.-*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Rôle des composés phénoliques. Marrakech: Diplôme de Doctorat d'Etat, Université Cadi Ayyad.

Ziouti A, El Modafar C, El Mandili A, El Boustani E, Macheix JJ. (1996) Identification des acides caféoylshikimiques des racines du palmier dattier, principaux composés fongitoxiques vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *J. Phytopathol*, 114: 197-202.

Ziouti A, El Modafar C, Fleuriet A, El Boustani S, Macheix JJ. (1992) Les polyphénols, marqueurs potentiels de la résistance du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) au *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Compte rendu du Groupe Polyphénols, 16 : 346–349.

ANNEXES

Annexe 1

Préparation des milieux de culture

Milieu de culture	Composition
PDA : potato dextrose agar	Pomme de terre 300 g/l Dextrose 20 g/l Agar 20 g/l pH
PDB : potato dextrose broth	Même composition que le PDA mais sans l'agar
SDA : Sabouraud dextrose agar	Dextrose 40 g/l Peptone 10 g/l Agar 5 g/l pH 5,6
SDB : Sabouraud dextrose broth	Même composition que SDA mais sans l'agar
Gélose nutritive	Extrait de viande 1 g/l Extrait de levure 2,5 /l Peptone 5 g/l Agar 15 g/l pH 7,0

Annexe 2

I- Préparation du fixateur Glutaraldéhyde (1 %) - Paraformaldéhyde (2 %) – Caféine (1 %)

Paraformaldéhyde à 10 %	20 ml
Glutaraldéhyde (solution à 50%)	2 ml
Tampon phosphate 0,25 M pH 7,2	50 ml
Caféine	1 g
Eau	28 ml

Préparation du Paraformaldéhyde à 10 %

Paraformaldéhyde	2 g
Eau bi-distillée	20 ml
- Sous hotte, chauffer le mélange sur un agitateur magnétique chauffant.	
- Lorsque la suspension frémît (~80°C), ajouter 1 goutte d'une solution alcaline de soude et attendre une dizaine de secondes l'éclaircissement de la suspension.	
- Refroidir rapidement (en mettant l'Erlen ou le Becher dans la glace).	

II- Préparation du Réactif de Schiff

- Mettre 1 g de pararosaniline (Sigma; Réf. P 1528) dans 200 ml d'eau bouillante et laisser refroidir à 50° C puis filtrer.
- Ajouter 2 g de métabisulfite de sodium anhydre et 20 ml d'acide chlorhydrique N.
- Laisser reposer 24 heures à l'obscurité, puis ajouter 0,5 g de charbon actif, agiter et filtrer rapidement.

III- Préparation d'eau sulfureuse

Métabisulfite de sodium (5 %)	20 ml
Acide chlorydrique N	20 ml
Eau distillée	360 ml

IV- Préparation de Naphtol blue black (Sigma; Réf. N 3005)

Naphtol blue black	1 g
Acide acétique	7 ml
Eau distillée QSP	100 ml

Annexe 3

Préparation du formaldéhyde 4%

formaldéhyde à 8% 1 volume

tampon phosphate 0.2M pH 7.4 1 volume

Le formaldéhyde est préparée de la même façon que le paraformaldéhyde (annexe 2)

Préparation du tampon PIPES (50mM) pH 7

PIPES 15,12 g/l

Ajuster le pH en ajoutant de la soude solide

Filter

Préparation du tampon phosphate salin (PBS) pH 7,2

(**PBS = Phosphate Buffered Saline**)

KH₂PO₄ 0,2 g

Na₂HPO₄, 2 H₂O₂ 1,4 g

NaCl 19 g

Eau distillée q.s.p. 1 litre

PBST

Ajouter 0,5 ml/litre de Tween 20 au tampon PBS ci-dessus.