Revue Ezzaitouna 15 (1 et 2), 2019

OPTIMISATION PRELIMINAIRE DU MILIEU ET DES CONDITIONS DE CULTURE DE LA SOUCHE OEE1 DE *BACILLUS VELEZENSIS* POUR L'AMELIORATION DE LA SECRETION DES METABOLITES ANTIFONGIQUES DIFFUSIBLES EFFICACES CONTRE *VERTICILLIUM DAHLIAE*

Manel Cheffi[1], Imen Medhioub[1], Yaakoub Gharbi[1], karim Ennouri, Mohamed Ali Triki[1]

Résumé

La composition du milieu de culture et les conditions d'incubation ont une influence sur la croissance microbienne et la production de métabolites par la bactérie. Dans cette étude, le pouvoir antagoniste de *Bacillus velezensis* OEE1 influant l'activité inhibitrice de la croissance du champignon *Verticillium dahliae* Vms2 a été optimisé en ajoutant 15 g L^{-1} glucose, 0.5 g L^{-1} $MgSO_4$, 0.4 mg L^{-1} $CuSO_4$ et 0.05 g L^{-1} $FeSO_4$, avec un pH du milieu de culture égal à 7. De plus, la température d'incubation permettant d'obtenir une production de biomasse et une activité antifongique maximale a été estimée à 30 °C pendant 72h. L'efficacité de cette optimisation a été confirmée sur des racines et des rameaux d'oliviers inoculés par *V. dahliae.* La mesure des nécroses provoquées par ce dernier confirme que la souche OEE1 est capable de réduire jusqu'à 8% l'extension des zones nécrotiques et notamment dans le cas de traitement préventif.

Mots clés: *Bacillus velezensis*, *Verticillium dahliae,* bactérie, champignon, conditions, incubation, antagoniste, optimisation, olivier, nécroses.

Abstract

Medium culture composition and incubation conditions have a direct influence on microbial growth and metabolite production by bacterium. In our study, the antognist effect of *Bacillus velezensis* OEE1 influencing the inhibitory activity of *Verticillium dahlia* development was enhanced by adding 15 g L^{-1} glucose, 0.5 g L^{-1} $MgSO_4$, 0.4 mg L^{-1} $CuSO_4$ and 0.05 g L^{-1} $FeSO_4$, with a neutral pH of medium. Furthermore, the incubation temperature involving optimal production was estimated to 30 °C during 72h. The efficiency of this optimization has been confirmed on olive tree roots and twigs inoculated by *V. dahliae.* Necrosis Measures provoked by this fungus confirmed the fact that OEE1 strain is able to decrease until 8 % the expansion of necrotic zones and particularly in the case of preventive treatment.

Keywords: *Bacillus velezensis*, *Verticillium dahliae,* bacterium, fungus, conditions, incubation, antagonist, optimization, olive tree, necrosis.

---

* Institut de l'Olivier, Sfax

1. Introduction

Les oliveraies sont parmi les systèmes agroforestiers les plus répondus de la région méditerranéenne (Pérez-Priego *et al.,* 2014) et ils peuvent fournir des ressources écologiques et économiques importantes (Herder *et al*., 2015) d'où l'augmentation constante de l'expansion du système industriel et du marché international oléicole. Cependant, la situation actuelle de l'industrie oléicole en Tunisie n'a pas atteint un niveau acceptable et de nombreux problèmes techniques, qui rendent la production d'huile d'olive Tunisienne fluctuante, doivent encore être résolus. Pour remédier aux effets négatifs de ces fluctuations et garantir par conséquent une production régulière, une stratégie basée sur l'orientation vers la mise en place des cultures intensives voire même hyper intensives était adoptée. Cette orientation a entraîné l'apparition de nouveaux phytopathogènes en raison de la forte teneur en humidité. Plusieurs études épidémiques ont montré l'apparition de nouveaux cas de dépérissement en Tunisie causés par plusieurs champignons sur des oliviers, tels que *Nigrospora* sp., *Phoma fungicola* (Krid Hadj Taieb et *al.,* 2014a, 2014b), *Neonectria radicicola*, *Neofusicoccum australe* (Triki *et al.,* 2014, 2015), *Fusarium* spp. (Trabelsi *et al.,* 2017) et *Verticillium dahliae* (Triki *et al.,* 2006 ; Gharbi e*t al.,* 2014).

Ce dernier champignon cause des dégâts considérables aux oliviers et de nombreuses espèces végétales (Triki *et al.,* 2006 ; Gharbi *et al.,* 2014).

Pour lutter contre ces maladies, les agriculteurs ont utilisé les pesticides chimiques d'une façon aberrante afin de préserver leurs cultures. Cette utilisation abusive représente une menace pour l'environnement et la santé humaine. De plus, la lutte chimique non raisonnée se heurte à d'autres principaux problèmes tels que l'apparition de résistances et le coût élevé pour traiter les champignons pathogènes (Gharbi *et al.,* 2014).

Durant ces dernières années la prise de conscience de la préservation de l'environnement a poussé les chercheurs à trouver de nouvelles méthodes de lutte plus écologiques. En effet, des efforts considérables ont été déployés pour trouver des méthodes de lutte biologique. Ce contrôle biologique a été utilisé dans différents domaines de la biologie, mais en phytopathologie, cette approche est appliquée pour l'utilisation des agents de contrôle biologique (BCA) pour lutter contre ces maladies. L'intérêt des chercheurs a été orienté surtout vers les souches de *B. velezensis* pour le bio-contrôle et la fertilisation (Adeniji *et al.,* 2019). En effet, suite à une recherche établie sur champ par Cai *et al.,* en 2017, il a été démontré que l'extrait des métabolites de *B. velezensis* CC09 a pu réduire l'incidence de mildiou du blé de 86,12% suite à un essai établi sur champ. De même, Chen *et al.,* (2018) ont prouvé que l'extrait de *B. velezensis* LM2303, réduisait de manière significative l'incidence et la gravité de la fusariose du blé causée par l'agent pathogène *F. graminearum*. La souche BAC03 de *B. velezensis* a été identifiée comme

un antagoniste efficace du *Streptomyces scabies* qui est un agent pathogène de diverses cultures dont la betterave, la carotte, le concombre, le poivron, la pomme de terre, le radis, la courge, la tomate et le navet. *B. velezensis* YC7010 est capable d'induire une résistance systémique chez Arabidopsis contre *Myzus persicae* qui est un insecte destructeur de la sève du phloème causant des pertes considérables (Rashid *et al.,* 2017). La souche OEE1 est efficace pour lutter contre la fusariose et la verticilliose de l'olivier (Cheffi *et al.,* 2019 ; 2020).

Le choix d'un agent de bio-contrôle approprié est basé sur le choix d'un pathosystème convenable, le choix d'une méthode d'isolement efficace et la fixation des critères d'évaluation et de caractérisation des performances des isolats et généralement, les antagonistes sont classés en fonction de leur capacité à inhiber la croissance du pathogène (Köhl *et al.,* 2009). La souche OEE1 de *Bacillus velezensis* a montré, dans des travaux antérieurs, une forte aptitude à inhiber une multitude de champignons phytopathogènes à travers plusieurs mécanismes tels que la production des métabolites secondaires dont les lipopetides et des composés organiques volatiles ou encore la compétition pour l'espace et les nutriments (Cheffi *et al.,* 2019 ; 2020).

Dans ce cadre et dans le but d'amplifier d'avantage l'activité antifongique de la souche OEE1 de *B. velezensis*, surtout celle assurée par les métabolites diffusibles, une optimisation préliminaire des conditions de culture a été réalisée en suivant la croissance du pathogène tellurique *Verticillium dahliae* en appliquant la méthode de diffusion des métabolites antifongiques dans le milieu de culture.

2. Matériel et méthodes

2.1 Bactérie antagoniste

La souche bactérienne *B. velezensis* OEE1 utilisée dans cette étude a été isolée par Cheffi *et al.* (2019) à partir des racines d'un olivier sain de variété chemlali. Cette souche a été sélectionnée parmi une dizaine de souches endophytes grâce à son grand pouvoir antifongique.

2.2 Champignon phytopathogène

L'isolat Vms2 de *V. dahliae* utilisé dans cette étude est obtenu à partir de la collection fongique de l'institut de l'olivier (Sfax, Tunisie). Cet isolat a été précédemment sélectionné grâce à son fort pouvoir pathogène (Gharbi *et al.,* 2014). La culture fongique se fait sur milieu potato dextrose agar (PDA) à 25°C.

2.3. Matériel végétal

Des rameaux des oliviers de variété chemlali situés dans une parcelle à Sidi Bouakkazine (Mahres, Sfax).

2.4. Fongicide testé

Les molécules chimiques fongicides appliquées dans cette étude sont l'azoxystrobine et mefenoxam sous forme suspo-émulsion sous le nom commercial Uniform® 446SE. C'est une fongicide systémique utilisée pour le contrôle des champignons telluriques. Il est utilisé à une dose de 200 ml hl^{-1}.

2.5. Etude de la concentration minimale inhibitrice de la croissance de *V. dahliae*

L'incorporation du filtrat de surnageant bactérien est effectuée à différentes proportions dans le milieu de culture PDA. Le filtrat est obtenu par filtration stérile du surnageant d'une culture liquide de 72 h de la bactérie *B. velezensis*OEE1. En effet, la culture bactérienne est centrifugée à une vitesse de 4000 rpm à 4 °C. Ensuite, le surnageant obtenu est filtré stérilement par un filtre seringue (0.22 µm). Le filtrat obtenu est mélangé avec le milieu PDA tiède à des proportions allant de 5 à 75 % puis coulés dans des boites de Petri. Après solidification, un disque gélosé du pathogène de 2 mm est mis au centre de chaque boite. Le test s'achève après incubation des boites à 25 °C, lorsque les filaments mycéliens atteignent la périphérie de la boite dans les lots témoins. L'évaluation de l'inhibition exercée par le filtrat testé est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule de Dohou *et al*. (2004) : PI = [(D1-D2) /D1] *100. Avec :

PI: Pourcentage d'inhibition du champignon

D1: Diamètre moyen du mycélium dans les boites témoin (mm)

D2: Diamètre moyen du mycélium en présence du filtrat bactérien (mm)

2.6. Optimisation préliminaire de l'activité antifongique contre *V. dahliae*

Les conditions de culture influencent énormément les capacités métaboliques du microorganisme producteur des molécules biologiquement actives. Ainsi, vu l'intérêt appliqué aux molécules bioactives produites par la souche OEE1, les travaux de recherche relatifs à cette partie ont été consacrés à l'amélioration des conditions physicochimiques de production des biomolécules actives.

Les conditions de culture ont été optimisées avec variation de la température d'incubation (25, 30, 35, 40 et 45 °C), le pH initial du milieu de culture (5, 6, 7, 8 et 9) et le temps d'incubation (24, 48, 72, 96 et 120 heures).

L'effet de chaque paramètre est évalué en utilisant les tests d'inhibition de la croissance mycélienne par diffusion du filtrat des cultures bactériennes dans le milieu PDA à des proportions de 25 et 50 %

2.7. Application de la souche *B. velezensis* pour la lutte contre la verticilliose de l'olivier

2.7.1. Préparation de la culture de l'antagoniste

La bactérie *B. velezensis* est mise en culture dans le milieu LB liquide optimisé à 30°C sous agitation à 150 rpm. Après 72h, la culture est ajustée à une concentration de 10^8 UFC/ml.

2.7.2. Préparation de l'inoculum fongique de *V. dahliae*

La culture fongique est préparée dans le milieu potato dextrose broth PDB par grattage d'une boite contenant le champignon *V. dahliae*. La culture est incubée à une température de 25°C avec agitation de 100 rpm pendant 6 jours. Les spores sont ajustées à 10^6 spores/ml à l'aide d'une cellule de Malassez.

2.7.3 Etude de l'activité antifongique sur des rameaux d'olivier

Des rameaux des oliviers sains, de 10 cm de longueur, ont été rincées et désinfectées par 3% d'eau de javel pendant 10 minutes. Les rameaux ont été déposés dans des tubes stériles contenant chacun:

- De l'eau distillée stérile servant comme témoin sain
- Une suspension sporale de *V. dahliae* pour le témoin malade
- Une suspension de *B. velezensis* pour contrôler l'effet de la bactérie sur les rameaux
- Des rameaux sont mis dans la suspension sporale de *V. dahliae* puis, après une semaine, ils ont été transmis dans des tubes contenant la suspension de *B. velezensis* pour le traitement curatif bactérien et dans des tubes contenant le fongicide commercial pour le traitement curatif chimique.
- Des rameaux sont mis dans la suspension de *B. velezensis* pour le traitement préventif bactérien et dans des tubes contenant le fongicide commercial pour le traitement préventif chimique. Puis, après une semaine, ils ont été transmis dans des tubes contenant la suspension sporale de *V. dahliae*.

A la fin du test, la longueur de la nécrose est mesurée pour les différents groupes. Pour chaque test, sept rameaux ont été utilisées et l'expérience a été répétée 3 fois.

2.8. Etude statistique

L'analyse de la variance (ANOVA) et le test T d'échantillons indépendants mis en œuvre dans le logiciel de statistique PASW Statistics 18 (Paswstat, version 18.0.0) ont été utilisés pour analyser des résultats obtenus. Un test post-hoc de HSD de Duncan a également été appliqué pour comparer les groupes une fois que des effets significatifs ont été détectés. Le niveau de signification a été fixé pour tous les tests statistiques à 5 % ($p < 0.05$).

3. Résultats et discussion

3.1 Etude de la concentration minimale inhibitrice

La détermination de la concentration minimale inhibitrice est une étape essentielle pour fixer les doses minimales du filtrat bactérien aboutissant à une activité maximale. Pour cela, le champignon *V. dahliae* est mis en culture dans des boites de Petri contenant le milieu PDA pur (contrôle) et mélangé avec différentes proportions du filtrat de la culture bactérienne d'OEE1 allant de 5 à 75 % (figure 1).

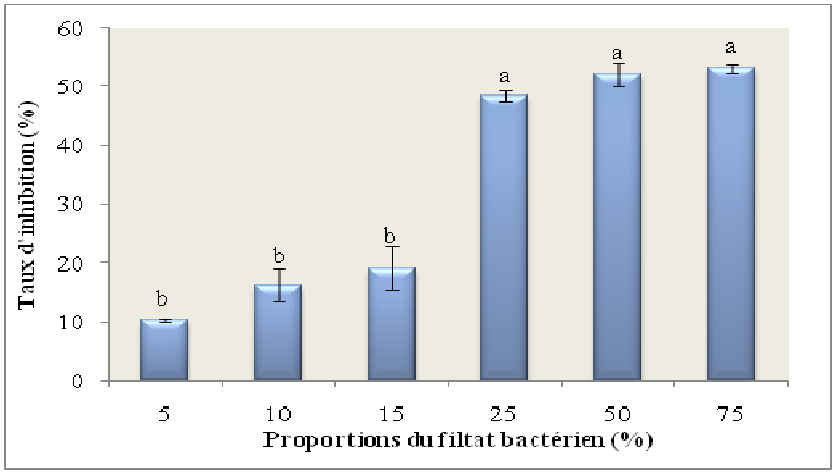

Figure 1. Effet du filtrat d'une culture de la bactérie antagoniste *B. velezensis* OEE1 sur la croissance mycélienne de *V. dahliae* (Les valeurs des colonnes représentées par une même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan à un seuil d'erreur de $p < 0.05$)

L'effet du filtrat est marqué par une réduction de la croissance du pathogène d'environ 50% pour les proportions 25, 50 et 75% dans le cas de *V. dahliae*. Pour des concentrations plus faibles (5, 10 et 15%) l'activité inhibitrice n'a pas excédé les 20%. Selon les travaux antérieurs de Cheffi *et al.* (2019), la souche OEE1 de *B. velezensis* était capable d'inhiber la croissance de plusieurs champignons et oomycètes. Le pourcentage d'inhibition de *Phytophthora ramorum*, *P. cactorum*, *P. cryptogea*, *P. plurivora* et *P. rosacearum* variait de 40% à 75%. L'inhibition de *Pythium* spp. et *Phytopythium* spp. était plus modérée que delle de *Phytophthora* spp. et elle est aux alentours de 25% et dans le cas de *Pythium sylvaticum*, *P. ultimum* et *P. vexans* l'inhibition était de 40%. De plus, la souche OEE1 s'est révélée efficace contre *Fusarium avenaceum*, *F. sulphureum*, *Cladosporium cladosporioides* et *Botrytis cinerea* avec une inhibition allant de 40% à 60%. Cette activité est assurée grâce à plusieurs métabolites secondaires diffusibles et volatiles (Cheffi *et al.,* 2020).

Cependant, malgré la forte réduction de la croissance, observée surtout dans le cas du champignon *V. dahliae*, après application de la méthode de confrontation directe sur milieu gélosé qui arrive jusqu'à 92% (Cheffi *et al.,* 2019), celle-ci devient nettement plus faible après application de la méthode de diffusion (Cheffi *et al.,* 2020). Torres *et al.* (2016) ont expliqué cette chute d'activité par l'état de la culture bactérienne et les interactions subites lors de l'incubation pour la production des métabolites inhibiteurs de la croissance du pathogène. L'optimisation des conditions et du milieu de culture devient dans ce cas une nécessité afin d'améliorer cette activité.

3.2. Variation de la température et de la période d'incubation et du pH du milieu

La température d'incubation est un paramètre très important pour la sécrétion des métabolites secondaires antifongiques et pour la survie des microorganismes (Coutte *et al.,* 2010). Dans ce cadre, l'effet de ce paramètre est vérifié en incubant la culture de l'antagoniste *B. velezensis* OEE1 à des températures allant de 25 °C à 45 °C. La figure 2a montré que l'incubation à 30°C, donne une activité antifongique maximale au voisinage de 60% accompagnée d'une production importante de la biomasse de la souche OEE1 ($p < 0.05$).

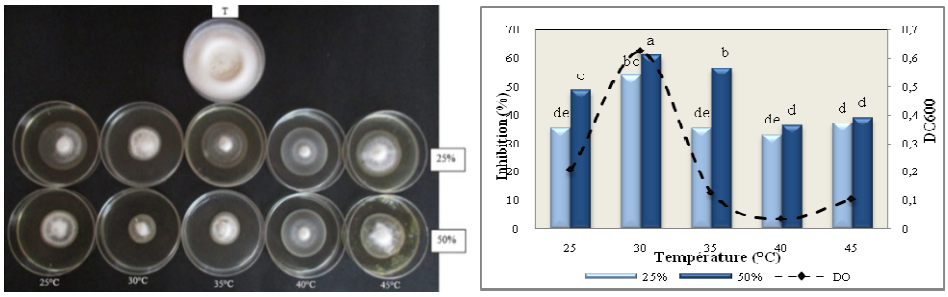

Figure 2. Effet de la température d'incubation sur l'activité antifongique de *B. velezensis* (Les valeurs des colonnes représentées par une même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan à un seuil d'erreur de $p < 0.05$)

L'étude de l'effet du temps d'incubation de la culture bactérienne de *B. velezensis* OEE1 sur l'activité antifongique est illustrée dans la figure 3.

Cette activité est maximale après 72 h d'incubation où le pourcentage d'inhibition a atteint 50 % avec une importante production de biomasse cellulaire et ce en comparant la densité optique à 600 nm de culture de *B. velezensis* OEE1 aux différents temps d'incubation testés ($p < 0.05$).

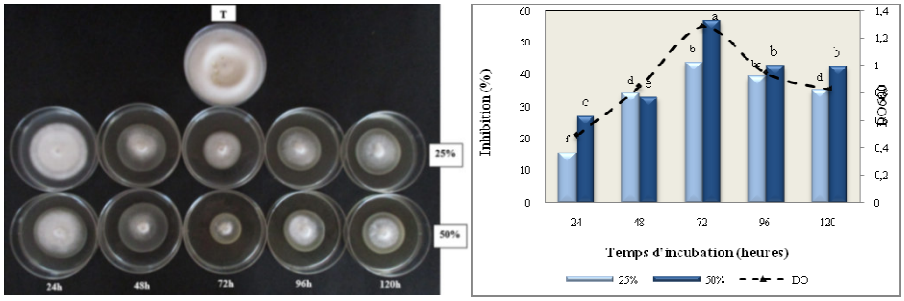

Figure 3. Effet de la variation de la période d'incubation sur l'activité antifongique de *B. velezensis* (Les valeurs des colonnes représentées par une même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan à un seuil d'erreur de $p < 0.05$)

Un autre paramètre étudié est la variation du pH du milieu de culture. En effet, cette étude prouve qu'avec une concentration de 50%, l'activité antifongique atteint son maximum avec un optimum de production de biomasse à pH 7 ($p < 0.05$) (figure 4).

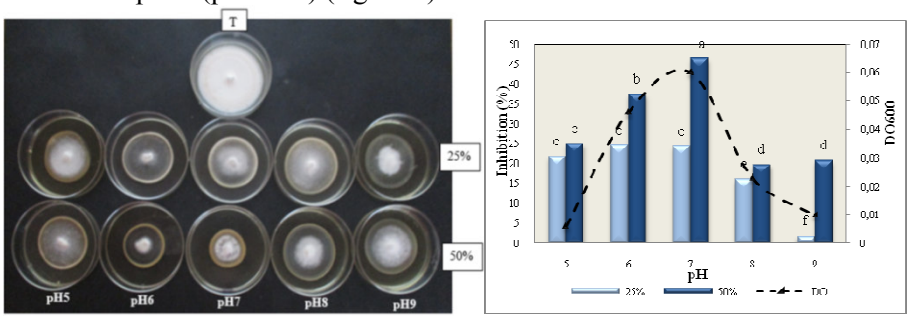

Figure 4. Effet du pH du milieu de culture sur l'activité antifongique de *B. velezensis* OEE1 (Les valeurs des colonnes représentées par une même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan à un seuil d'erreur de $p < 0.05$)

Selon les résultats précédents, la production de composés antimicrobiens a été fortement influencée par les conditions de culture comme le milieu pH, la température et la durée d'incubation. Cette influence sur l'activité biologique a été rapportée dans plusieurs recherches (El-Sersy *et al*., 2010; Yin *et al*., 2011). Tabbene et Ben Slimen (2009) ont insisté, dans leur étude, que l'optimisation de ces paramètres est nécessaire pour la surproduction de ces produits antimicrobiens. Meena *et al.* (2018), à leur tour, ont optimisé les conditions de culture de *B. velezensis* et ont bien confirmé que la production des lipopeptides antifongiques atteint son maximum à une température de 30 °C, à un pH neutre et après une incubation de 72 heures. Ces résultats confirment les travaux d'optimisation préliminaires établis sur la souche OEE1 de *B. velezensis*.

3.3. Application de la souche *B.velezensis* sur des ramaux d'olivier pour la lutte contre *V. dahliae*

Cette étude est réalisée sur des rameaux d'olivier selon différentes modalités pour comparer l'effet du pathogène en présence et en absence de l'antagoniste.

Les nécroses provoquées par le pathogène sont mesurées après 7 jours de l'essai. L'extension de la zone nécrotique causée par *V. dahliae* sur les rameaux des oliviers a montré l'effet antagoniste de la souche OEE1.Après 7 jours du début de l'assai, des nécroses ont été observées sur les rameaux inoculés par *V. dahliae*. Le traitement préventif en présence de la souche OEE1 engendre une faible propagation du pathogène qui est de l'ordre de 8% en comparaison par le témoin malade qui est totalement nécrosé (figure 5). Le traitement par cette bactérie parait sans grand effet pour le traitement curatif et

de même pour les traitements curatif et préventif avec le fongicide chimique ($p < 0.05$).

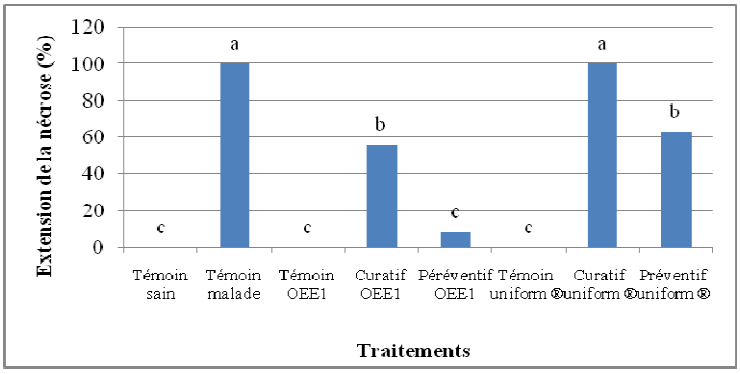

Figure 5. Extension nécrotique causée par *V. dahliae* sur les rameaux d'olivier

Les résultats des travaux de Cheffi *et al.* (2020) réalisés sur des vitroplants et en plein champs confirment l'efficacité de cette souche de *B. velezensis* après optimisation des conditions et du milieu de culture pour lutter efficacement contre *V. dahliae.* En fait, il est connu que le contrôle de la verticilliose est vraiment difficile, car le pathogène peut persister dans le sol pendant de nombreuses années sous forme de microsclérotes (Markakis *et al*., 2015) et les hyphes émergents de ces microsclérotes pénètrent dans les racines des plantes (Prieto *et al*., 2009). Par conséquent, l'utilisation de BCA pourrait constituer une stratégie potentielle de gestion de cette maladie (Markakis *et al*., 2015). L'application de la souche OEE1 a réduit l'incidence de la verticilliose qui est due à la réduction de la germination des microsclérotes (Cheffi *et al.,* 2020). En fait, dans leur étude, Antonopoulos *et al*., (2008) ont expliqué l'effet de la réduction de la germination microsclérotes sur la gravité de la verticilliose. Selon Deketelaere *et al*. (2017) l'une des caractéristiques souhaitables d'un BCA efficace contre *V. dahliae* est la capacité de perturber la survie ou la germination des microsclérotes.

4. Conclusion

Les maladies fongiques de l'olivier sont responsables de pertes économique et agronomique considérables. Le contrôle de ces maladies reste difficile ou même impossible. Le recours au contrôle biologique utilisant des bactéries endophytes a réduit ces dégâts et notamment les dangers provoqués par les fongicides chimiques. Les essais de la lutte biologique nécessitent des ressources matérielles et humaines et du temps considérables. Pour cela, le potentiel antagoniste des agents de bio-contrôle a souvent été testé au préalable par des méthodes de dépistage *in vitro* en utilisant des milieux de cultures gélosés permettant d'avoir des résultats clairement discriminants.

En effet, l'isolement et le criblage des bactéries endophytes antagonistes aux pathogènes des oliviers ont été utilisés comme point de départ de la sélection d'une souche désignés OEE1 de *B. velezensis* ayant une forte activité antifongique sur plusieurs champignons pathogènes. Cette souche est capable d'inhiber d'une façon intéressante la croissance de *V. dahliae* surtout après optimisation des conditions de culture. Ce qui fait de cette souche un éventuel agent de bio-contrôle très efficace.

Références bibliographiques

Adeniji AA., Loots DT., Babalola OO. 2019. *Bacillus velezensis*: phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103(9):3669-3682.

Antonopoulos DF., Tjamos SE., Antoniou PP., Rafeletos P., Tjamos EC. 2008. Effect of *Paenibacillus alvei*, strain K165, on the germination of *Verticillium dahliae* microsclerotia in planta. *Biol Control* 46(2), 166–170.

Cai XC., Liu CH., Wang BT., Xue YR. 2017. Genomic and metabolic traits endow *Bacillus velezensis* CC09 with a potential biocontrol agent in control of wheat powdery mildew disease. *Microbiol Res* 196:89–94.

Cheffi Azabou M., Gharbi Y., Medhioub I., Ennouri K., Barham H., Tounsi S., Ali Triki M. 2020. The endophytic strain *Bacillus velezensis* OEE1: An efficient biocontrol agent against Verticillium Wilt of Olive and a potential plant growth promoting bacteria. *Biological Control* 142.

Cheffi M., Bouket AC., Alenezi FN., Luptakova L., Belka M., Vallat A., Rateb ME., Tounsi S., Triki MA., Belbahri L. 2019. *Oleaeuropaea*L. Root Endophyte *Bacillus velezensis* OEE1 Counteracts Oomycete and Fungal Harmful Pathogens and Harbours a Large Repertoire of Secreted and Volatile Metabolites and Beneficial Functional Genes. *Microorganisms* 7(9), 314.

Chen L., Heng J., Qin S., Bian K. 2018. A comprehensive understanding of the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against Fusarium head blight. *PLoS One* 13:e0198560.

Coutte F., Lecouturier D., Yahia SA., Leclère V., Béchet M., Jacques P., Dhulster P. 2010. Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis*in a bubbleless membrane bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 87(2):499-507.

Deketelaere S., Tyvaert L., França SC., Höfte M. 2017. Desirable Traits of a Good Biocontrol Agent against Verticillium Wilt. *Front. Microbiol* 8: 1186.

Dohou N., Yamani K., Badoc A., Douira A. 2004. Activité antifongique d'extraits de *Thymelaealythroides* sur trois champignons pathogènes du riz. *Bull Soc Pharm* 143: 31-38.

Gharbi Y., Triki MA., Trabelsi R., Fendri I., Daayf F., Gdoura R. 2014. Genetic structure of *Verticillium dahlia* isolates infecting olive trees in

Tunisia using AFLP, pathogenicity and PCR markers. *Plant Pathology* 64,871–879.

El-Sersy NA., Ebrahim HA., Abou-Elela GM. 2010. Response surface methodology as a tool for optimizing the production of antimicrobial agents from *Bacillus licheniformis* SN 2. *Curr Res Bacteriol* 3, 1–14.

Herder M., Moreno G., Mosquera-Losada MR., Palma JHN., Sidiropoulou A., Santiago Freijanes JJ., Crous-Duran J., Paulo J., Tomé M., Pantera A., Papanastasis V., Mantzanas K., Pachana P., Papadopoulos A., Plieninger T., Burgess PJ. 2015. Current extent and trends of agroforestry in the EU27. Deliverable Report 1.2 for EU FP7 Research Project: AGFORWARD 2nd Edition, 76.

Knudsen IM., Hockenhull J., Jensen D. 1995. Biocontrol of seedling diseases of barley and wheat caused by *Fusarium culmorum* and *Bipolarissorokiniana*: effects of selected fungal antagonists on growth and yield components. *Plant Pathol* 44, 467-477.

Köhl J., Molhoek WML., Groenenboom-de Haas BH., Goossen-van de Geijn HM. 2009. Selection and orchard testing of antagonists suppressing conidia production of the apple scab pathogen *Venturiainaequalis*. *Eur J Plant Pathol* 401-414.

Krid Hadj Taieb S., Cheffi M., Rhouma A., Triki MA. 2014a. First report of dieback of olive trees caused by *Nigrospora* sp. in Tunisia. *Journal of Plant Pathology* S4.123.

Krid Hadj Taieb S., Triki MA., Hammami I., Rhouma A. 2014b. First report of dieback of olive trees caused by *Phoma fungicola* in Tunisia. *Journal of Plant Pathology* 97 (1), 209-220.

Markakis EA., Tjamos SE., Antoniou PP., Paplomatas EJ., Tjamos EC. 2015. Biological control of Verticillium wilt of olive by *Paenibacillus alvei*, strain K165. *Bio Control* 293–303.

Meena KR., Tandon T., Sharma A., Kanwar SS. 2018. Lipopeptide antibiotic production by *Bacillus velezensis* KLP2016. *J Appl Pharm Sci* 8:091–098.

Pal KK., McSpadden GB. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor* 1117-02.

Pérez-Priego O., Testi L., Kowalski AS., Villalobos FJ., Orgaz F. 2014. Aboveground respiratory CO2 effluxes from olive trees (*Olea europaea* L.). *Agroforestry Systems* 245–255.

Pliego C., Cayo R., de Vicente A., Cazorla FM. 2011. Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant Soil* 340, 505–520.

Prieto P., Navarro-Raya C., Valverde-Corredor A., Amyotte SG., Dobinson KF., Mercado-Blanco J. 2009. Colonization process of olive tissues by *Verticillium dahliae* and its *in planta* interaction with the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *Microb Biotechnol* 2, 499–511.

Rashid MHO., Khan A., Hossain MT., Chung YR. 2017. Induction of systemic resistance against aphids by endophytic *Bacillus velezensis* YC7010 via expressing phytoalexin deficient4 in Arabidopsis. *Front Plant* Sci 8:211.

Tabbene O., Ben Slimene I. 2009. Optimization of Medium Composition for the Production of Antimicrobial Activity by *Bacillus Subtilis* B38. *Wiley Inter Science* 25(5):1267-74.

Torres MJ., Pérez Brandan C., Petroselli G., Erra-Balsells R., Audisioa MC. 2016. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophominaphaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiological Research* 31-39.

Trabelsi R., Gdoura R., Triki M. 2017. *Fusarium brachygibbosum* and *Fusarium chlamydosporum* causing wilt and die-back of olive in Tunisia. *Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration* 581-582.

Triki MA., Gharbi Y., Krid S., Cheffi M., Rahma T., Hammami I., Rhouma A., Gdoura R. 2014. First report of *Neonectria radicicola* associated with root rot disease of olive in Tunisia. *Journal of Plant Pathology* S4.128.

Triki MA., Hassairi A., Mahjoub M. 2006. First observations of *Verticillium dahliae* on olive trees in Tunisia. *EPPO Bulletin* pp 69-71.

Triki MA., Krid Hadj Taieb S., Cheffi M., Gharbi Y., Rhouma A. 2015. First report of dieback of olive trees caused by *Neofusicoccum australe* in Tunisia. *Journal of Plant Pathology* 97 (1), 209-220.

Yin XT., Xu LN., Xu L., Fan SS., Liu ZY., Zhang XY. 2011. Evaluation of the efficacy of endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* against *Botryosphaeria dothidea* and other phytopathogenic microorganisms. *Afr J Microbiol Res* 5, 340–345.