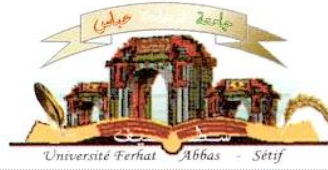


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/2016

THÈSE

Présentée par

ABED Hanane

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT 3^{ÈME} CYCLE

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: MICROBIOLOGIE

THÈME

**Dépistage et utilisation des rhizobactéries antagonistes (*Pseudomonas* et
Bacillus) dans la lutte biologique contre la fusariose du pois chiche
induite par *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris***

Soutenue publiquement le 11/01/2017

Devant le Jury :

Président : M. HARZALLAH Daoud Pr. Université Ferhat Abbas Sétif-1

Rapporteur : M. ROUAG Nouredine MCA. Université Ferhat Abbas Sétif-1

Examineurs: M. KECHA Mouloud Pr. Université Abderrahmane Mira Bejaia

M. DEHIMAT Laid Pr. Université Frères Mentouri Constantine 1

M. BENHIZIA Yacine Pr. Université Frères Mentouri Constantine 1

Laboratoire de Microbiologie Appliquée – UFAS Sétif-1

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au Laboratoire de Microbiologie Appliquée Faculté des Sciences de la Nature de la Vie, Université Ferhat Abbas –Sétif.

L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par M. ROUAG Nouredine, Maître de conférences en Microbiologie. Je tiens vivement à lui exprimer ma profonde reconnaissance et ma gratitude pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension, et les intérêts portés pour mon sujet de recherche.

Mes remerciements les plus chaleureux vont au président du jury, M. HARZALLAH Daoud Professeur de Microbiologie à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Sétif d'avoir eu l'amabilité d'accepter volontairement et aimablement de critiquer et de juger ce travail. Je suis particulièrement reconnaissante et honorée par sa participation au jury

Je tiens à remercier également M. BENHIZIA Yacine, Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université des Frères Mentouri de Constantine, d'avoir accepté, de lire et de juger ce travail. Qu'il trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.

Que M.DEHIMAT Laid, Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université des Frères Mentouri de Constantine, trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements, d'avoir ménagé son temps pour juger et critiquer ce travail.

Mes plus vifs remerciement vont à M. KECHA Mouloud, Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Abderrahmane Mira Bejaia, d'avoir accepté, de lire et de juger ce travail. Qu'il trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.

Je tiens aussi à exprimer mes remerciements les plus sincères au Professeur LAROUS Larbi Professeur de Microbiologie à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Sétif de m'avoir proposé au départ ce thèmes de recherche avant qu'il ne prend sa retraite.

Un énorme merci à tous ceux qui m'ont aidé, m'ont conseillé, m'ont ouvert leurs portes, parfois même avec un sourire, et qui se reconnaîtront sans que je n'ai à citer leurs noms. Tout le corps technique et enseignant de la faculté, chacun d'entre vous a participé activement au bon déroulement de ce travail de thèse et sans vous, certaines études expérimentales n'auraient pu être réalisables.

Je n'oublierai jamais de remercier ma très chère mère et mon regretté et défunt père, pour m'avoir permis d'aller jusqu'au bout. Par l'occasion, je remercie, toute ma famille, mes sœurs Nassima, Malika, Hasna et Nora; mes frères Elhadi et Abbas.

J'ai laissé exprès à la fin mes remerciements à mon mari Ameer, pour avoir été là tout simplement au quotidien et avoir relevé tous les défis.

Je dédie ce travail à ma fille Alaerrahman.

Hannane

Résumé

Résumé

L'objectif de ce travail est d'étudier la capacité des souches rhizobactériennes appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus* prélevées à partir des principales zones de culture du pois chiches en Algérie, dans le biocontrôle de la croissance mycélienne du *Fusarium oxysporum f.sp.ciceris*. Les tests d'inhibition antifongiques *in vitro* réalisés avec 152 souches bactériennes ont montré que 66 souches possèdent une activité antifongique élevée contre *Fusarium oxysporum f.sp.ciceris*. Ces souches ont été par la suite caractérisées à travers des tests pour la production des composés extracellulaires diffusibles et volatiles tels que la Cellulase, la Chitinase, la Protéase, l'Amylase, la Lipase, la Phosphatase, les sidérophores, le cyanure d'hydrogène (HCN), l'acide acétique indole (AIA) et la production d'Ammoniac. Les résultats montrent que les souches affiliées au genre des *Pseudomonas* sont fortement productrices des métabolites comme la phosphatase, AIA et les Sédiphores. Alors que les souches affiliées au genre des *Bacillus* sont fortement productrices des enzymes exocellulaires telles que la chitinase, cellulase, et les protéases. Aussi, les résultats de la confrontation directe montrent que l'inhibition de la croissance mycélienne du FOC est le résultat de l'action combinée des composés volatiles et des produits diffusibles. En ce qui concerne l'action des produits diffusibles, très peu de différence existe entre les deux groupes de *Bacillus* et de *Pseudomonas* et leurs espèces apparentées. En revanche, l'action des substances volatiles produites par les souches de *Bacillus* est plus prononcée que celle obtenue avec les souches de *Pseudomonas*. D'une manière générale, la sensibilité des isolats du FOC, elle à l'avantage des produits volatile par rapport aux produits diffusibles. L'identification des souches bactériennes basée sur l'API 50 CHB, a mis en évidence la présence de neuf espèces de *Bacillus* et espèce apparentées à savoir *B.subtilis* ; *B.lentus* ; *B.cereus* ; *B.circulans* ; *B.licheniformis* ; *B.firmus* ; *B.amyloliquefaciens* ; *Brevisbacillus laterosporus* and *Aneurinibacillus aneurinilyticus* et l'utilisation des galeries API 20 NE a montré l'existence de cinq espèces de *Pseudomonas* et espèces apparentées à savoir *Pseudomonas luteola*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Sentrophomonas maltophilia* et *Sphingomonas paucimobilis*. Les tests de pathogénicité montrent que les isolats FOC1 et FOC2 sont les plus pathogènes à travers la série de symptômes induits, allant du flétrissement latéral au dessèchement total du plant infecté. Par ailleurs, dans des tests *in planta* de biocontrôle des plants de pois chiche infectés artificiellement par le FOC1 et le FOC2 à travers l'utilisation des souches rhizobactériennes, les données ont changé radicalement en comparaison avec les résultats des tests *in Vitro*. En général, les performances de protection sont corrélées significativement avec les résultats de production des différents produits diffusibles et volatiles impliquées dans le biocontrôle.

Mots-clés: Antagoniste, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Fusarium oxysporum f.sp.ciceris*, pois chiches, biocontrôle.

Abstract

The aim of this work is to study the ability of several strains of rhizobacteria belonging to two genera *Pseudomonas* and *Bacillus* sampled from the main growing areas of chickpeas in Algeria, in the biocontrol of mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f.sp.ciceris. *In vitro* antifungal inhibition tests performed with 152 bacterial strains showed that 66 strains have a high antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f.sp.ciceris. These strains were subsequently characterized through tests for the production of extracellular diffusible and volatiles compounds such as cellulase, chitinase, protease, Amylase, Lipase, Phosphatase, the Sédiphores, hydrogen cyanide (HCN), indole acetic acid (AIA) and ammonia production. The results show that *Pseudomonas* and related species are highly productive of metabolites such as phosphatase, AIA and Sedrphers. While *Bacillus* and related species are highly productive of exocellular enzymes such as chitinase, cellulase, and proteases. Also, the results of the direct confrontation show that the inhibition of the FOC mycelial growth is the result of the combined action of volatile and the diffusible compounds products. As regards the action of diffusible products, there is very little difference between the two groups of *Bacillus* and *Pseudomonas* and their related species. On the other hand, the action of the volatile substances produced by the *Bacillus* strains is more pronounced than that obtained with the strains of *Pseudomonas*. In general, the FOC isolates were more sensitive to the volatile products compared to diffusible products. The identification of bacterial strains based on API 50 CHB, revealed the presence of nine species of *Bacillus* and related species namely *B. subtilis*; *B.lentus*; *B.cereus*; *B.circulans*; *B. licheniformis*; *B. firmus*; *B. amyloliquefaciens*; *Brevisbacillus laterosporus* and *Aneurinibacillus aneurinilyticus* and use of API 20 NE galleries showed the existence of five species of *Pseudomonas* and related species namely *Pseudomonas luteola*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Sentrophomonas maltophilia* and *Sphingomonas paucimobilis*. The Pathogenicity tests show that FOC1 and FOC2 isolates are more pathogenic through the series of induced symptoms, ranging from side wilting total dryness of the infected plant. Furthermore, *in planta* tests for the biocontrol of chickpea plants artificially infected by the FOC1 and FOC2 through the use of interesting strains of rhizobacteria, data have changed dramatically compared with *in vitro* test results. In general, the performance protection is significantly correlated with the production of various diffuse and volatile products involved in the biocontrol.

Keywords: Antagonist, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Fusarium oxysporum* f.sp.ciceris, chickpeas, biocontrol.

المخلص

يهدف هذا البحث إلى دراسة قدرة عدة عزلات بكتيرية من جنسي *Bacillus* و *Pseudomonas* والتي تم عزلها من التربة الجذرية لنبات الحمص من العديد من المناطق الزراعية في الجزائر، في مكافحة الفطر *Fusarium oxysporum f.sp.ciceris*. أظهرت اختبارات التثبيط المضادة للفطريات في المختبر أجريت على 152 سلالة بكتيرية أن 66 سلالة لها نشاط مضاد عالي ضد الفيوزاريوم أو كسيسبورم *f.sp.ciceris*. وأثبتت هذه السلالات في وقت لاحق من خلال اختبارات متنوعة قدرتها على إنتاج العديد من المركبات التي تنتشر خارج الخلية ومواد متطايرة مثل السيلولوز، كيتيناز، البروتي از، الأميلاز، الليباز، الفوسفاتيز، سيدروفورها، سيانيد الهيدروجين (HCN)، وحمض الإندول الخليك (IAA) وإنتاج الأمونيا. وأظهرت النتائج أن السلالات التابعة لجنس *Pseudomonas* تنتج بكترة مواد الأيض مثل الفوسفاتيز، حمض الإندول الخليك و سيدروفورها. في حين أن السلالات التابعة للجنس *Bacillus* تنتج الانزيمات خارج الخلية مثل كيتيناز، السيلولوز، والبروتياز. وتظهر نتائج المواجهة المباشرة أيضا، على أن تثبيط نمو الفطر هو نتيجة العمل المشترك بين المركبات المتطايرة والمنتجات الانتشارية ومن خلاله فالفارق كبير جدا بين المجموعتين والأنواع ذات الصلة، غير أن تأثير المواد المتطايرة كان أكثر وضوحا عند سلالات من بكتيريا *Bacillus* من تلك التي حصلت مع سلالات *Pseudomonas*. تحديد السلالات البكتيرية على أساس API 50 CHB، كشفت وجود تسعة أنواع من بكتيريا *Bacillus* وذات الصلة وهي *B.lentus*. *B.cereus*. *B.circulans*. *B.licheniformis*. *B. firmus*. *B. amyloliquefaciens*. *Brevisbacillus laterosporus* و *Aneurinibacillus aneurinilyticus* واستخدام API 20NE أظهرت وجود خمسة أنواع من *Pseudomonas* والأنواع ذات الصلة وهي *Pseudomonas luteola*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Sentrophomonas maltophilia* et *Sphingomonas paucimobilis*. وتشير التجارب المرضية أن FOC1 و FOC2 هي العزلات الأكثر مسببة للأمراض من خلال سلسلة من الأعراض الناتجة، والتي تتراوح من الجفاف الجانبي إلى الذبول الكلي للنبات المصاب. وعلاوة على ذلك، فالاختبارات التي أجريت على نباتات الحمص مصابة بشكل إصطناعي من قبل FOC1 و FOC2 باستعمال مكافحة الحيوية من خلال استخدام سلالات بكتيرية rhizobactériennes من جنس *Bacillus* و *Pseudomonas*، تغيرت البيانات بشكل كبير مقارنة مع نتائج الاختبار في المختبر. بشكل عام، تثبت الوقاية بشكل كبير مع نتائج المواد القليلة للانتشار و المواد المتطايرة التي تفوزها السلالات البكتيرية المشاركة في مكافحة البيولوجية.

كلمات البحث : المواجهة، *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Fusarium oxysporum f.sp.ciceris*، الحمص، مكافحة البيولوجية.

Table de matière

Résumés	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	3
1.1. Le pois chiche (<i>cicer arietinum L</i>)	3
1.1.2. Taxonomie de pois chiche	3
1.1.3. Itinéraire technique	4
1.1.4. Types de cultivars chez le pois chiche	4
1.1.4.1. Macrosperma (Kabuli type)	4
1.1.4.2. Microsperma (Desi type)	4
1.1.5. Place du pois chiche en Algérie	4
1.1.5.1. Aire de culture et production du pois chiche en Algérie	5
1.1.5.2. Importance du pois chiche	6
1.1.5.2.1. Importance agronomique du pois chiche	6
1.1.5.2.2. Importance économique du pois chiche	6
1.1.5.2.3. Importance alimentaire du pois chiche	7
1.1.6. Principales maladies du pois chiche en Algérie	8
1.1.6.1. L'Anthracnose du pois chiche (<i>Ascochyta rabiei</i>)	8
1.1.6.2. La pourriture racinaire	8
1.1.6.2.1. La pourriture sèche	8
1.1.6.2.2. La pourriture noire	9
1.1.6.3. La fusariose (<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ciceri</i>)	9
1.2. Généralités sur le <i>Fusarium oxysporum</i>	9
1.2.1. Classification et phylogénie du <i>Fusarium oxysporum</i>	10
1.2.2. Description et identification du FOC	11
1.2.3. Cycle évolutif de la maladie	11
1.2.4. La lutte contre la fusariose du pois chiche	13
1.2.4.1. La lutte phytosanitaire chimique	13
1.2.4.2. Les méthodes culturales	14
1.2.4.3. Les méthodes génétiques	14
1.2.4.3.1. L'utilisation de variétés résistantes	14
1.2.4.3.2. L'utilisation des espèces sauvages de pois chiche	15
1.2.4.3. La lutte biologique	15
1.2.4.3.1. Avantages des biopesticides	16
1.2.4.3.2. Inconvénients des biopesticides	17
1.3. Les rhizobactéries antagonistes	17
1.3.1. Le genre <i>Bacillus</i>	17
1.3.1.1. Classification et phylogénie des <i>Bacillus</i>	18
1.3.1.2. Taxonomie moderne des <i>Bacillus</i>	19
1.3.1.3. Principaux caractères des <i>Bacillus</i>	20
1.3.1.4. Caractéristiques métaboliques des <i>Bacillus</i>	21
1.3.1.5. Distribution écologique des <i>Bacillus</i>	22
1.3.1.6. <i>Bacillus</i> comme agents de biocontrôle	23
1.3.2. Le genre <i>Pseudomonas</i>	26
1.3.2.1. Principaux caractères des <i>Pseudomonas</i>	26
1.3.2.2. Caractéristiques métaboliques des <i>Pseudomonas</i>	27

1.3.2.3. Classification et phylogénie des <i>Pseudomonas</i>	28
1.3.2.4. Distribution écologique des <i>Pseudomonas</i>	30
1.3.2.5. Importance des <i>Pseudomonas</i>	30
1.3.2.6. <i>Pseudomonas</i> fluorescents comme agents de biocontrôle.....	32
Chapitre II : étude du pouvoir antagoniste antifongique <i>In Vitro</i> des rhizobactéries	34
1. Introduction	34
2. Matériels et méthodes	35
2.1. Echantillonnage et aires de culture	35
2.2. Isolement et purification de l'agent pathogène (FOC).....	35
2.3. Identification des isolats de <i>Fusarium oxysporum</i> fs. <i>Ciceris</i>	35
2.3.1 Caractérisation macroscopique	35
2.3.2 Caractérisation microscopique.....	36
2.4. Effets des facteurs physicochimiques sur la croissance des isolats du FOC.....	36
2.4.1. Effet du milieu de culture sur la croissance mycélienne et la sporulation.....	36
2.4.2. Effet de la température sur la croissance mycélienne.....	36
2.4.3. Effet du pH du milieu sur la croissance mycélienne.....	37
2.4.4. Effet de la lumière sur la croissance mycélienne et la sporulation.....	37
2.5. Etude de l'activité antagoniste <i>in vitro</i>	37
2.5.1. Inhibition de la croissance mycélienne <i>in vitro</i>	37
2.5.2. Etude de l'antagonisme par les composés volatiles	38
II.2.6. analyse statistique des résultats.....	39
3. Résultats et discussion	39
3.1. Isolement de l'agent pathogène	39
3.1. Caractérisation morphologique des souches rencontrées.....	39
3.1.1 Caractérisation macroscopique.....	41
3.1.2 Caractérisation microscopique des isolats de FOC	45
3.2. Effets des facteurs physicochimiques sur la croissance des isolats du FOC.....	45
3.2.1- Effets de la température sur la croissance mycélienne.....	46
3.2.2- Effet du pH du milieu sur la croissance mycélienne.....	47
3.2.3. Effet de la lumière et l'obscurité sur la croissance mycélienne et la sporulation.....	49
3.3. Détermination du pouvoir antagoniste antifongique <i>In Vitro</i> des rhizobactéries.....	53
3.3.1 Activité antagoniste des composés diffusibles envers les isolats du FOC.....	53
3.3.1.1 Le cas des souches bactériennes <i>Bacillus</i>	53
3.3.1.2. Le cas des souches bactériennes <i>Pseudomonas</i>	54
3.3.1.3. Activité antagoniste des <i>Bacillus</i> et <i>Pseudomonas</i> envers le <i>Fusarium solani</i>	56
3.3.2 Activité antagoniste des composés volatiles envers les isolats du FOC.....	56
3.3.2.1. Le cas des souches bactériennes <i>Bacillus</i>	56
3.3.2.2. Le cas des souches bactériennes <i>Pseudomonas</i>	60
3.3.2.3. Comparaison des pouvoirs antagonistes des <i>Bacillus</i> et <i>Pseudomonas</i>	61
Conclusion	65
Chapitre III : Biocontrôle de la fusariose du pois chiche par les rhizobactéries <i>In planta</i>	66
III.1. Introduction	66
III.2. Matériels et méthodes	67
III.2.1. Etude de la pathogénicité des isolats du FOC	67
III.2.1.1. Préparation de matériel fongique (l'inoculum).....	67
III.2.1.2. Préparation du matériel végétal.....	67
III.2.1.3. Technique d'inoculation des plantules de pois chiche.....	67

III.2.2. Etude de l'activité antagoniste <i>in planta</i>	68
III.2.2.1. Préparation de l'inoculum bactérien	68
III.2.2.2. Préparation de l'inoculum fongique.....	68
III.2.2.3. Traitement des graines avec les antagonistes.....	69
III.2.2.4. Traitement du sol par le pathogène	69
III.2.3. Traitement des résultats et analyse statistique	69
III.3. Résultats et discussion	70
III.3.1. Etude de la pathogénicité des isolats du Foc.....	70
III.3.1.1. Effet des isolats du Foc sur le nombre de ramification.....	70
III.3.1.2. Effet des isolats du Foc sur la longueur de tige.....	71
III.3.1.3. Effet des isolats du Foc sur la longueur des racines	73
III.3.1.4. Effet des isolats du Foc sur le poids de la partie racinaire.....	74
III.3.1.5. Effet des isolats du FOC sur le poids de la partie végétative.....	77
III.3.1.6. Symptômes observés et sélection des variétés et des isolats.....	79
III.3.2. Etude du biocontrôle de la fusariose par les rhizobactéries	81
III.3.2.1. Effet antagoniste des rhizobactéries sur le nombre de ramification	81
III.3.2.2. Effet antagoniste des rhizobactéries sur la longueur de la tige.....	82
III.3.2.3. Effet antagoniste des rhizobactéries sur la longueur de la racine	84
III.3.2.4. Effet antagoniste des rhizobactéries sur le poids frais du système racinaire	84
III.3.2.5. Effet antagoniste des rhizobactéries sur le poids frais du système végétatif	85
III.3.3. Etude de l'effet PGPR des rhizobactéries sur les variétés de pois chiche.....	86
III.3.3.1. Effet PGPR des souches bactériennes le nombre de ramification.....	86
III.3.3.2. Effet PGPR des souches bactériennes sur la longueur de la tige.....	87
III.3.3.3. Effet PGPR des souches bactériennes sur la longueur de la racine.....	88
III.3.3.4. Effet PGPR des souches bactériennes sur le poids frais du système racinaire....	89
III.3.3.5. Effet PGPR des souches bactériennes le poids frais du système végétatif.....	90
III.4. Discussion biocontrôle par les rhizobactéries.....	92
Conclusion	94
Chapitre IV : Identification et caractérisation des rhizobactéries antagonistes	95
Introduction	95
IV.2. Matériel et méthodes	95
IV.2.1. Isolement et purification des rhizobactéries.....	96
IV.2.2. Identification des rhizobactéries.....	96
IV.2.2.1. Etude des caractères morphologiques.....	96
IV.2.2.2. Aspect microscopique.....	97
IV.2.3. Détermination des types et enzymes respiratoires.....	97
IV.2.4. Production des enzymes respiratoires terminales	97
IV.2.4.1. Recherche de l'oxydase.....	97
IV.2.4.2. Recherche de la catalase.....	98
IV.2.4.3. Recherche de la gélatinase	98
IV.3. Caractérisation et identification des souches de <i>Pseudomonas</i>	98
IV.3.1. Production de pigment fluorescent.....	99
IV.3.2. Détermination de la température optimale.....	99
IV.3.3. Système d'identification microbien	99
IV.3.3.1 Préparation de la galerie	99
IV.3.3.2 Préparation de l'inoculum.....	100
IV.3.3.3 Inoculation de la galerie.....	100
IV.3.3.4 Lecture des résultats de la galerie.....	100
IV.3.3.4.1. Mise en évidence NO ₃	101

IV.3.3.4.2. Mise en évidence du TRP.....	101
IV.3.3.4.3. Mise en évidence des tests d'assimilation.....	101
IV.4. caractérisation et identification des souches de <i>Bacillus</i>	101
IV.4.1. Système et identification des souches de <i>Bacillus</i>	102
IV.4.1.1 Préparation de la galerie	102
IV.4.1.2 Préparation de l'inoculum.....	102
IV.4.1.3 Inoculation de la galerie.....	103
IV.4.1.4 Lecture des résultats de la galerie.....	103
IV.5. Effet des conditions physicochimiques du milieu sur la croissance bactérienne.....	103
IV.5.1 Action des agents physicochimiques	103
IV.5.1.1. Action du pH	103
IV.5.1.2. Action du NaCl.....	103
IV.6. Résultats et discussion	104
IV.6.1. Identification des souches de <i>Bacillus</i>	104
IV.6.1.1 Caractérisation macro et microscopiques des souches de <i>Bacillus</i>	104
IV.6.1.2. Détermination des types et des enzymes respiratoires.....	105
IV.6.1.3. Identification biochimique des souches de <i>Bacillus</i>	105
IV.6.1.3.1. Résultats de fermentation des sucres simples.....	106
IV.6.1.3.2. Résultats de fermentation oligosaccharides et polysaccharides.....	106
IV.6.1.3.3 Résultats de fermentation des polyalcools.....	106
IV.6.1.3.4 Résultats de fermentation des hétérosides et acides uroniques	106
IV.6.2. Récapitulatif des souches de <i>Pseudomonas</i> identifiées.....	107
IV.6.2.1. Caractérisation macro et microscopiques des souches de <i>Pseudomonas</i>	111
IV.6.2.2. Détermination des types de respiration et les enzymes respiratoires.....	112
IV.6.2.3. Identification biochimique des souches de <i>Bacillus</i>	113
IV.6.2.3.1. Tests conventionnel	113
IV.6.2.3.2. Tests d'assimilation.....	113
IV.6.3. Récapitulatif des souches de <i>Bacillus</i> identifiées.....	114
IV.7. Effet des conditions physicochimiques du milieu sur la croissance.....	118
IV.7.1. Effet du pH sur la croissance bactérienne.....	118
IV.7.2. Effet du NaCl sur la croissance bactérienne.....	119
Conclusion	122
Chapitre V : Détermination des substances impliquées dans l'antagonisme bactérien	123
V.1. Introduction	123
V.2. Matériel et méthodes	124
V.2.1. Production des enzymes.....	124
V.2.1.1. Production de la Phosphatase.....	124
V.2.1.2- Production d'enzymes dégradant les parois cellulaires (CWDE).....	124
V.2.1.3. Production d'enzymes protéolytiques	125
V.2.1.3.1. Production de la Cellulase	125
V.2.1.3.2. Production de la lipase (triacylglycerol acylhydrolase)	125
V.2.1.3.3. Production de l' α -amylase	126
V.2.2. Synthèse des sidérophores.....	126
V.2.3. Synthèse de l'acide indole acétique (AIA)	126
V.2.3.1. Quantification de l'acide indole acétique (AIA).....	127
V.2.3. Production des antibiotiques	127
V.2.3.1. Production des antibiotiques volatiles (HCN)	127
v.2.3.1.1. Quantification des antibiotiques volatiles (HCN).....	128
v.2.3.1.2. Production de l'ammoniac	128

v.2.3.2. Production des antibiotiques diffusibles	129
v.3. Résultats et discussion	129
v.3.1. Production des enzymes.....	129
v.3.1.1. Production de la Phosphatase	129
v.3.1.2- Production d'enzymes dégradant les parois cellulaires (CWDE).....	132
V.3.2. Synthèse des sidérophores	136
V.3.3. Synthèse de l'acide indole acétique (AIA).....	137
v.3.4. Production des antibiotiques volatiles	141
V.3.4.1. 1.Quantification des antibiotiques volatiles (HCN).....	141
V.3.4.1.2. Production de l'ammoniac	141
Conclusion	144
Conclusion générale	145
Références bibliographiques.....	149
Annexes	
Résumés	

Liste des abréviations

°C: Degré Celsius
µl : microlitre
µm: micromètre
AAC : Agriculture et Agroalimentaire Canada
ADN: Acide Désoxyribonucléique
B : *Bacillus*
C: Cytosine
Cm: Centimètre
f sp: Forme spécialisée
FAO: Food and Agriculture Organisation
FOC *Fusarium oxysporum* fsp *ciceris*
FS : *Fusarium solani*
g : Gramme
G: Guanine
Ha: Hectare
HCN : Hydrogène cyanure
IAA: Indole-3-Acétique Acide
ICARDA: International Center for Agricultural in the Dry Areas
ICRISAT : International Crops Research Institute For The Semi-Arid Tropics
ITGC: Institut Technique des Grandes Cultures
Kcal : Kilo calorie
Kj : Kilo joule
mg: Milligramme
mm: Millimètre
Mt: Millions de tonnes
P : *Pseudomonas*
PDA : Potato Dextrose Agar
PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria
pH: Potentiel d'hydrogène
PM: Poids moléculaire
PNDA : Programme National du Développement agricole
Prod: production
Qx: Quintaux
Rpm: Rotation par minute
T: Témoin
UFC: Unity Forming Colony
UI : unité injectable
USDA : United States Department of Agriculture
USFDA : United States Food and Drug Administration
VOCs : Composés Organiques Volatiles

Liste des figures :

Figure	Titre	Page
Figure 1	Plant de pois chiche complètement desséché. Plant récolté de l'ITGC de Sétif.....	12
Figure 2	Cycle de vie de <i>Fusarium oxysporum</i>	13
Figure 3	Souche de <i>Bacillus subtilis</i> vu sous microscope électronique.....	18
Figure 4	<i>Pseudomonas</i> sp observé sous microscope électronique.....	27
Figure 5	Inhibition du champignon par les produits diffusibles selon Vincent et al. (1991).....	38
Figure 6	Aspects des colonies fongiques des différents isolats de <i>Fusarium oxysporum</i> fs <i>ciceris</i> sur le milieu PDA et sur le milieu de SNA.....	43
Figure 7	Aspects microscopiques du FOC	44
Figure 8	Histogramme de la croissance mycélienne sous l'effet de différents degrés de température.....	45
Figure 9	Histogrammes de la croissance mycélienne sous l'effet de pH.....	47
Figure 10	Confrontation directe bactérie antagoniste – champignon pathogène in vitro..	52
Figure 11	Inhibition de la croissance mycélienne par les produits volatiles.....	59
Figure 12	Histogramme Comparaison des pouvoirs antagonistes entre les <i>Bacillus</i> et <i>Pseudomonas</i> et le <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Ciceris</i>	62
Figure 13	Nombre de ramification en fonction des isolats et des variétés.....	70
Figure 14	Courbe représentant les moyennes de ramification / variété et / isolat du Foc.....	71
Figure 15	Longueur de tige en fonction des isolats (à gauche) et des variétés (à droite).....	72
Figure 16	Courbe des moyennes de longueur de tige par variété et par isolat du Foc.....	73
Figure 17	Longueur des racines en fonction des isolats (à gauche) et des variétés (à droite).....	73
Figure 18	Courbe des moyennes de longueur des racines par variété et par isolat du Foc.....	74
Figure 19	Poids du système racinaire en fonction à gauche isolats et à droite des variétés.....	75
Figure 20	Courbe des moyennes du poids des racines par variété et par isolat du Foc...	76

Figure 21	Poids frais du système végétatif en fonction des isolats et des variétés.....	76
Figure 22	Courbe des moyennes du poids du système végétatif / variété et / isolat du Foc.....	77
Figure 23	Symptômes observés sur les variétés testées induits par les isolats du Foc.....	80
Figure 24	Moyennes du nombre de ramification en fonction des bactéries et des Focs.....	81
Figure 25	Moyennes de la longueur de la tige en fonction des rhizobactéries et des Focs..	82
Figure 26	Moyennes de la longueur de la racine en fonction des bactéries et des Focs.....	83
Figure 27	Moyennes du poids du système racinaire en fonction des bactéries et des Focs	84
Figure 28	Moyennes du poids du système végétatif en fonction des bactéries et des Focs	85
Figure 29	Effet PGPR des rhizobactéries sur le nombre de ramifications des variétés.....	87
Figure 30	Effet PGPR des rhizobactéries sur la longueur de la tige des variétés.....	88
Figure 31	Effet PGPR des rhizobactéries sur la longueur de la racine des variétés.....	89
Figure 32	Effet PGPR des rhizobactéries sur le poids frais du système racinaire	90
Figure 33	Effet PGPR des rhizobactéries sur le poids frais du système végétatif	91
Figure 34	Exemple d'identification les souches.....	115
Figure 35	Croissance des souches bactériennes mesurée en DO en fonction du pH.....	119
Figure 36	Croissance des souches bactériennes mesurée en DO en fonction de différentes concentration d'NaCl.....	121
Figure 37	Halo présent autour de la colonie bactérienne synonyme de production de phosphatase sur le PVK.....	131
Figure 38	Exemple sur les différentes testes enzymatique étudiée.....	135
Figure 39	Production des sidérophores par les souches bactériennes sur le milieu CAS-O	140
Figure 40	Production de l'AIA en présence de L-tryptophane par les souches bactériennes.....	140
Figure 41	Production de L'HCN par les isolats de Bacillus et de Pseudomonas	143
Figure 42	Production de L'NH ₃ par les souches de Bacillus et de Pseudomonas.....	143

Liste des Tableaux

N°	Titre	Page
Tableau 1	Evolution des superficies, productions, rendement et semences, du pois chiche en Algérie durant la dernière décennie.....	6
Tableau 2	Production de pois chiche dans le monde en tonnes durant le deux dernières années.....	7
Tableau 3	Produits commerciaux de biocontrôle à base de <i>Bacillus</i>	23
Tableau 4	Caractéristiques macroscopiques des colonies des isolats de FOC sur les milieux de cultures.....	40
Tableau 5	Effet des milieux culture sur la croissance et la sporulation des isolats de FOC.....	40
Tableau 6	analyse de la variance de l'effet de milieu sur la sporulation des isolats de FOC.....	41
Tableau 7	Analyse de la variance de l'effet de la température sur la croissance mycélienne des quatre isolats de FOC.....	46
Tableau 8	Analyse de variance de l'effet de pH sur la croissance mycélienne de FOC...	47
Tableau 9	Effet de la lumière et l'obscurité sur la croissance mycélienne et la sporulation.....	48
Tableau 10	Analyse de variance de l'effet de la lumière sur la sporulation des isolats de FOC.....	48
Tableau 11	Classement des souches bactériennes en groupes selon le taux d'inhibition du FOC1.....	50
Tableau 12	Analyse de variance de l'effet antagoniste de 80 souches de <i>Bacillus</i> contre leFOC1.....	51
Tableau 13	Analyse de variance de l'effet antagoniste de 80 souches de <i>Pseudomonas</i> contre le FOC1.....	51
Tableau 14	Classement des souches de <i>Bacillus</i> selon l'action par les produits diffusibles	54
Tableau 15	Analyse de variance de l'effet antagoniste de 35 souches de <i>Bacillus</i> contre trois isolats de FOC et contre le FS.....	54
Tableau 16	Classement des souches de <i>Pseudomonas</i> selon l'action par les produits diffusibles.....	55
Tableau 17	Analyse de variance de l'effet antagoniste de souches de <i>Pseudomonas</i> contre les isolats fongiques.....	55
Tableau 18	Classement des souches de <i>Bacillus</i> selon l'action par les composés volatiles	57
Tableau 19	Analyse de variance de l'effet inhibiteur des souches de <i>Bacillus</i> par les produits volatiles.....	58

Tableau 20	Classement des souches de <i>Pseudomonas</i> selon l'action par les composés volatiles.....	61
Tableau 21	Analyse de variance de l'effet des composées volatiles sur la croissance de FOC.....	61
Tableau 22	Comparaison des pouvoirs antagonistes entre les <i>Bacillus</i> et <i>Pseudomonas</i>	62
Tableau 23	Analyse de variance de la variable dépendante : Nombre de ramification...	71
Tableau 24	Analyse de variance univariée de la variable dépendante : Longueur de la tige.....	72
Tableau 25	Analyse de variance de la variable dépendante: Longueur de la racine.....	74
Tableau 26	Analyse de variance de la variable dépendante: P.F. du système végétatif.....	75
Tableau 27	Analyse de variance de la variable dépendante: P.F. frais du système racinaire.....	77
Tableau 28	Analyse de variance de la variable dépendante: nombre de ramification.....	82
Tableau 29	Analyse de variance de la variable dépendante: longueur de la tige.....	83
Tableau 30	Analyse de variance de la variable dépendante: longueur de la racine.....	84
Tableau 31	Analyse de variance de la variable dépendante: P.F. frais du système racinaire.....	85
Tableau 32	Analyse de variance de la variable dépendante: P.F frais du système végétatif	86
Tableau 33	ANOVA de l'effet rhizobactéries et variétés sur le nombre de ramification ...	87
Tableau 34	ANOVA de l'effet rhizobactéries et variétés sur la longueur de tige	88
Tableau 35	ANOVA de l'effet rhizobactéries et variétés sur la longueur de la racine.....	89
Tableau 36	ANOVA de l'effet rhizobactéries et variétés sur le P. F. du système racinaire	90
Tableau 37	ANOVA de l'effet rhizobactéries et variétés sur le P. F. du système végétatif	91
Tableau 38	Caractères morphologiques des souches de <i>Bacillus</i> sélectionnées.....	104
Tableau 39	Enzymes respiratoires et type de respiration des souches de <i>Bacillus</i>	105
Tableau 40	Taux de probabilité des souches de <i>Bacillus</i> avec les espèces de référence.....	107
Tableau 41	Caractères morphologiques macro et microscopiques des souches de <i>Pseudomonas</i>	112
Tableau 41	Caractères physicochimiques relevés chez les souches de <i>Pseudomonas</i>	113
Tableau 42	Taux de probabilité des souches de <i>Pseudomonas</i> avec les espèces de référence.....	116

Tableau 43	Production de phosphatase par les isolats bactériens rencontrés.....	131
Tableau 44	Récapitulatif des tests de production des enzymes dégradant la paroi cellulaire	133
Tableau 45	Production qualitative et quantitative de l'AIA en présence de L-tryptophane (5mMol/l) à 535nm.....	138
Tableau 46	Production qualitative et quantitative de l'HCN à 625 nm	141

Liste des tableaux en Annexe 1

Tableau A: Effet de la température sur la croissance mycélienne des isolats du FOC.

Tableau B : Effet du pH sur la croissance mycélienne des isolats du FOC (en mm).

Tableau C: Inhibition de la croissance mycélienne des FOC rencontrés par les souches de *Bacillus* à travers les produits diffusibles.

Tableau D: Inhibition de la croissance mycélienne des FOC rencontrés par les souches de *Pseudomonas* à travers les produits diffusibles.

Tableau E : Inhibition de la croissance mycélienne des FOC rencontrés par les souches de *Bacillus* à travers les produits volatiles.

Tableau F: Inhibition de la croissance mycélienne des FOC rencontrés par les souches de *Pseudomonas* à travers les produits volatiles.

Tableau G: Effet des isolats du Foc sur le nombre de ramifications par plant de pois chiche

Tableau H: Effet des isolats du Foc sur la longueur de tige par plant de pois chiche

Tableau I : Effet des isolats du Foc sur la longueur de racine par plant de pois chiche

Tableau J : Effet des isolats du Foc sur le poids racinaire par plant de pois chiche

Tableau K : Effet des isolats du Foc sur le poids végétatif par plant de pois chiche

Tableau L : Assimilation des sucres simples par les isolats de *Bacillus* rencontrés.

Tableau M: Assimilation des sucres complexes par les isolats de *Bacillus* rencontrés.

Tableau N: Assimilation des polyalcools par les isolats de *Bacillus* rencontrés.

Tableau O: Assimilation des hétérosides et acides uroniques par les isolats de *Bacillus* rencontrés.

Tableau P: Résultats des tests conventionnels pour les différentes souches de *Pseudomonas* .

Tableau Q : Résultats des tests d'assimilation pour les différentes souches de *Pseudomonas*.

Tableau R: Mesure de la croissance des souches microbiennes en DO avec différentes concentration de NaCl.

Tableau S: Mesure de la croissance des souches microbiennes en DO avec différents pH.

Tableau T : Etude des métabolites secondaires produits par les souches de *Bacillus*.

Tableau U : Etude des métabolites secondaires produits par les souches de *Pseudomonas*.

Introduction générale

Introduction générale

Les légumineuses alimentaires représentent de part la superficie qu'elles occupent, une place importante dans le système agricole et agroéconomique de nombreux pays du monde, en raison des caractéristiques biologiques des racines dans la fixation de l'azote atmosphérique par les nodosités bactériennes (Bacha et Ounane 2003), et leur capacité d'adaptation à des conditions pédoclimatiques difficiles, ainsi que leur faible exigence culturale.

Les légumineuses alimentaires regroupent plusieurs espèces, parmi celles-ci nous avons le pois chiche (*Cicer arietinum* L.), dont la production et l'exploitation répondent à diverses fonctions, telles que, la consommation humaine, l'alimentation animale et la fertilisation du sol (Bacha et Ounane, 2003). Le pois chiche est, en Algérie, la seconde légumineuse alimentaire produite après les fèves, sa culture a connu durant la décennie 1980-1990, une certaine évolution progressive sur le plan superficies cultivées et de la consommation et une évolution régressive en terme de productivité (Anonyme, 1994). Les causes de la faiblesse de la productivité du pois chiche en Algérie sont souvent d'ordre agrotechnique, liées aux conditions de semis (période, mode de semis, qualité de semence) et les maladies cryptogamiques. Nous citons l'antracnose, les pourritures racinaires et le flétrissement. Cette dernière maladie rapporté initialement en Inde et par la suite dans de nombreux pays (Westerlund et al, 1974 ; Nene 1979 ; Halila et al, 1984), dont le Maroc (Rhrib, 1990), constitue la maladie la plus importante et la plus dévastatrice du pois chiche (Nene, 1979 ; Hawar, 1988).

Différentes méthodes de lutte existent contre la fusariose, parmi lesquelles on retrouve la lutte génétique : qui constitue l'un des moyens les plus sûrs pour réduire l'effet de la maladie. La sélection de génotypes dans les programmes de l'ICRISAT a permis la mise au point de cultivars résistants au flétrissement fusarien. Des travaux réalisés par Gaur et al (2005) ont permis d'évaluer deux cultivars avec une résistance complète et d'autre avec des résistances partielles. La lutte chimique, la désinfection des grains de pois chiche par cinq fongicides diminuent l'incidence de la maladie à un taux de 27.3% (Shukla et al, 1981), également le teste de neuf fongicides sur le FOC (Antracol, Benlate, Captan, Cobox, Dithane M.45, Nitropentachlorobenzène, Ridomil, Sancozeb et le Trimiltox, à différentes concentrations ont donné des niveaux d'efficacité très variables sur l'inhibition de la croissance mycélienne (Akram, 2004). La lutte biologique : en effet il existe dans le sol des microorganismes antagonistes naturels, des agents pathogènes telluriques, l'application de l'agent antagoniste *Trichoderma harzianum* avec des fongicides ont réduit la fréquence de la maladie de 63.3% alors que les fongicides seules ne la réduisent que l'ordre de 29.9% (Kaur,

1992). D'autres bactéries rhizosphériques du pois chiche telle que les *Pseudomonas sp*, les *Bacillus sp*, et les *Paenibacillus sp*, inhibent la croissance du FOC et permettent une diminution de l'incidence de la maladie (Blanca et al 1997 ; Blanca et al, 2002).

En Algérie, et en raison de la conjugaison de plusieurs facteurs liés à la phytotechnie de la culture de pois chiche (itinéraire technique souvent mal maîtrisé, variétés sensibles, absence de calendrier phytosanitaire, etc...), à cela s'ajoute des conditions environnementales dans la plupart des régions de cultures défavorables, font que *Fusarium oxysporum* f.s. *ciceris* fait des dégâts considérables, se traduisant par des pertes économiques préjudiciables. La recherche d'autres méthodes plus appropriées à nos conditions de cultures, techniquement réalisables, économiquement rentables et écologiquement acceptables, s'impose à tous les intervenants dans le domaine de la protection des cultures. C'est dans cet ordre d'idée que vient le présent travail de recherche et constitue justement une contribution de notre part. Il est articulé sur quatre objectifs ci-dessous cités :

- Recherche, isolement et identification du *Fusarium oxysporum* f.s. *ciceris* à partir des zones de cultures de pois chiche ;
- Recherche, isolement et caractérisation des isolats de *Bacillus sp*. et *Pseudomonas sp*. à partir des mêmes zones de cultures de pois chiche ;
- Etude du pouvoir antagoniste des Rhizobactéries isolées (*Bacillus* et *Pseudomonas*) contre le *Fusarium oxysporum* f.s. *ciceris* *in vitro* ;
- Etude de l'interaction des Rhizobactéries antagonistes, pathogène (*Fusarium oxysporum* f.s. *ciceris*) en cause et diverses variétés de la plante hôte chiche (*Cicer arietinum* L), *in vivo*.

Chapitre I
Synthèse bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. Le pois chiche (*Cicer arietinum* L.)

Le pois chiche est parmi les premières légumineuses à graines domestiquées par l'homme. Il constitue une importante source protéique et se présente comme un substitut aux protéines animales, disponibles à travers les viandes rouges et blanches, difficilement accessibles à de large frange des populations (Van Der Maesen, 1987). Le pois chiche est une légumineuse annuelle, autogame, herbacée (Slama, 1998). C'est une plante haute de 20 à 50 cm, à port dressé, cultivée pour ses graines rondes contenues au nombre de 1 ou 2 dans des gousses (Slama., 1998 *in* Ben Mbarek., 2011). Les premières traces d'utilisation du pois chiche comme aliment remontent à environ 7000 ans. Il aurait été cultivé pour la première fois dans la région méditerranéenne, il y a 5000 ans. Le pois chiche est originaire du Moyen-Orient, plus précisément du Sud-est de la Turquie et de la Syrie (Smithson *et al.*, 1985). Il arriva sur les côtes du bassin Méditerranéen après avoir traversé de nombreux pays et les Phéniciens pourraient être à l'origine de cette diffusion (Smithson *et al.*, 1985).

Davies (1969) et Ladizinsky (1975) ont découvert deux espèces sauvages au Sud-est de la Turquie et les ont dénommées respectivement *Cicer echinosperinum* Davis et *Cicer reticulatum* Ladiz. Ces deux espèces ne diffèrent pas beaucoup de l'espèce cultivées *Cicer arietinum* L. et ont en commun avec elle, des caractères morphologiques.

I.1.2. Taxonomie de pois chiche

Le pois chiche appartient à la famille des *Fabaceae* qui compte plus que 700 genres et 1800 espèces. Le genre *Cicer* (le nom *Cicer* est originaire du latin dérivé du mot grec « Kikus » qui désigne fort ou solide (Singh et Diwakar, 1995), le mot *arietinum* et aussi latin, traduit du mot « Krios », une allusion de la forme des graines qui ressemblent à la tête de bélier (Van Der Maesen, 1987). Ce genre comporte 44 espèces (Yadav *et al.*, 2007 ; Paterson *et al.*, 2000) dont neuf espèces sont annuelles et 35 sont des espèces pérennes. Ces espèces sont divisées en quatre sections : Monocicer, Chamacicer, Polycicer et Acanthocicer (Valcilova *et al.*, 2002 ; Van Der Maesen, 1987).

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) appartient au genre *Cicer* à la classe Dicotylédones, à la sous-classe des Dialypétales, l'ordre des Rosales, famille de Fabaceae, sous-famille des Papilionaceae, règne : Plantae, et à la section Monocicer (Bock., 2009 ; Yadav *et al.*, 2007 ; Staginnus *et al.*, 1999 ; Singh et Diwakar., 1995 ; Moreno et Cubero., 1978). *Cicer arietinum* est la seule espèce annuelle cultivée (Van Der Maesen, 1987).

I.1.3. Itinéraire technique

Le semis du pois chiche se fait au printemps dans la région Nord méditerranéenne. Les besoins en humidité dans le sol de la plante sont de 15- 40% pendant la germination et le développement de la graine ; l'humidité excessive du sol à la floraison réduit le rendement en grain (Wery *et al.*, 1994).

I.1.4. Types de cultivars chez le pois chiche

L'espèce *Cicer arietinum* L., présente une variabilité phénotypique et génotypique, et se divise en deux types : Kabuli et Desi (Singh, 1985). Les pois chiches de types Desi sont cultivés dans le sud de l'Asie où ils représentent la majorité de la production. Cependant les types Kabuli dominent la production dans la plupart des régions et spécialement dans l'hémisphère de l'Ouest (Muehlbauer et Rajesh, 2008). Les deux types sont destinés à la consommation humaine (Malhotra *et al.*, 1987).

I.1.4.1 Macrosperma (Kabuli type)

Ce type est cultivé dans la région méditerranéenne (Ohri et Pal, 1991) et couvre 15% de la surface réservée au pois chiche (Babar *et al.*, 2009 ; Muehlbauer et Rajesh., 2008 ; Singh et Jauhan., 2005 ; Singh et Diwakar., 1995).

I.1.4.2. Microsperma (Desi type)

Il est cultivé principalement dans le subcontinent indien (Ohri *et al.*, 1991) et compte environ 85% de la surface du pois chiche, il a souvent une petite forme (Erler *et al.*, 2009 ; Babar *et al.*, 2009 ; Singh et Jauhan., 2005 ; Iruela *et al.*, 2002).

I.1.5. Place du pois chiche en Algérie

En Algérie, les légumineuses alimentaires le plus cultivées sont : la lentille (*Lens culinaris* L.), le pois chiche (*Cicer areitinum* L.), le pois (*Pisum sativum* L.), la fève (*Vicia faba* L.) et l'haricot (*Phasiolus* L.). En dépit des subventions des pouvoirs publics, afin d'augmenter les superficies cultivées et la production des légumineuses alimentaires, mais les résultats obtenus n'ont pas été à la hauteur des efforts consentis (Bouzerzour *et al.*, 2003).

Le pois chiche est, en Algérie, la seconde légumineuse alimentaire produite après l'haricot avec une superficie de 33295 ha, emblavée durant la campagne agricole 2013/2014 avec une production d'environ 35118q et un rendement national moyen de l'ordre de 10,5q/ha (tableau 1). On constate que depuis l'application du programme national du développement

agricole (PNDA) à partir du début des années 2000, que la culture de pois chiche en Algérie a connu une nette évolution durant la dernière décennie, en matière des superficies emblavées qui étaient de l'ordre de 23079ha et une production de 16367q et un rendement national moyen de l'ordre de 7,1q/ha, données de la campagne agricole 2002/2003 (FAO, 2015).

Compte tenu des problèmes que connaît la culture du pois chiche en Algérie, particulièrement du point de vue comportement variétal vis-à-vis des facteurs biotiques (champignons, insectes, virus) et abiotiques (sécheresse, gelée, froids), l'évaluation des ressources génétiques locales devient indispensable pour créer des variétés productives, adaptées aux variations climatiques et résistantes aux maladies (Abdelgherfi *et al.*, 2000).

L'Algérie comporte peu de variabilité de pois chiche, les variétés où populations cultivées méritent, cependant, des études sérieuses pour en déterminer les caractéristiques qui font qu'elles soient encore appréciées par les agriculteurs (Bouzerzour *et al.*, 2003). Parmi les caractéristiques utilisables immédiatement, et qui sont susceptibles d'exister dans le germoplasme local, il y a la capacité de la fixation symbiotique de l'azote de l'air, l'hauteur de la plante, la résistance à l'égrenage, la résistance aux maladies cryptogamiques et la tolérance aux stress abiotiques (Singh *et al.*, 1998). Parmi les variétés les plus cultivées en Algérie, on trouve les variétés, ILC-3279 et ILC-482 introduites par l'ICARDA en 1988.

I.1.5.1. Aire de culture et production du pois chiche en Algérie

Le pois chiche en Algérie se cultive dans quatre zones principales (Benzohra, 2009), à savoir, les plaines littorales et sub-littorales, les plaines d'altitude de 700 à 900 m, les hautes plaines telliennes et au niveau des plaines basses telliennes. Les régions d'Ain Témouchent, Tlemcen, Sidi bel Abbas, Mostaganem et Mascara, constituent les régions productrices potentielles. En général, les productions n'ont pas évolué, au contraire les rendements ont connu une régression importante. Les niveaux actuels de rendements sont parmi les plus faibles dans le monde.

En effet, cette culture occupe environ 37.04% de la production des légumineuses alimentaires au niveau national. La production du pois chiche est répartie dans tout le nord d'Algérie, la plus grande part de la superficie nationale plus 48.30% se rencontre dans le Nord-Ouest Algérien. Alors que, le reste de la superficie est partagée dans les autres aires géographiques de production (Maatougi *et al.*, 1996).

Tableau 1: Evolution des superficies, productions, rendement et semences, du pois chiche en Algérie durant la dernière décennie (FAO, 2015).

Campagne agricole	Semences (q)	Superficie récoltée (ha)	Production (q)	Rendement (q/ha)
2003/2004	1167	23079	16367	7,1
2004/2005	1063	23348	13727	5,9
2005/2006	1034	21252	12706	6,0
2006/2007	1018	20681	14294	6,9
2007/2008	1114	20361	11211	5,5
2008/2009	1276	22274	17840	8,0
2009/2010	138.	25525	23474	9,2
2010/2011	1528	27734	24051	8,7
2011/2012	1466	30562	27675	9,1
2012/2013	1450	29320	34980	11,9
2013/2014		33295	35118	10,5

I.1.5.2. Importance du pois chiche

I.5.2.1. Importance agronomique du pois chiche

Dans les régions semi-arides du bassin méditerranéen où les ressources en eau sont en constante régression, les agricultures se rendent compte, de plus en plus, du rôle appréciable que jouent les légumineuses à graines dans la fertilisation organique de sol (Paccuci *et al*, 2006). En fait, le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est cultivé sur une large gamme de zones bioclimatiques qui s'étendent du subtropical, d'inde et le Nord-est de l'Australie, aux zones arides et semi-arides des régions du Bassin méditerranéen et de l'Australie Méridional (Paccuci *et al*, 2006). Le pois chiche peut fixer, par voie systémique, plus de 140Kg/ha d'azote atmosphérique et satisfaire plus de 80% de ses besoins en azote (Gaur *et al*, 2008). En raison de l'importance des quantités d'azote incorporées dans le sol et délaissées dans les résidus, la culture de pois chiche donne la fertilité du sol (ICRISAT, 2008).

I.1.5.2.2. Importance économique du pois chiche

A travers le monde, le pois chiche est l'une des plus importantes légumineuse à graines et en occupe la troisième position. Gaur *et al*. (2008) ont rapporté qu'il en occupe la seconde place avec une superficie de 11.2 millions d'hectares et une production annuelle estimée à 9.2 millions de tonnes et un rendement moyen de 820Kg/ha. Le continent asiatique est le plus important producteur de pois chiche avec 91% de la production mondiale, l'Inde produit 8, 280,000 tons de pois chiche en 2015 (Chandrashekarplus, 2015). La production de pois chiche en 2015 a été estimée en 12 million tons, alors que en 2014 la production atteinte à 13,5 million tons ce retour de production revient à les pertes de rendement en Inde environ

de 700,000 (Tableau 2). Par ailleurs, les grands pays producteurs sont : l'Inde, la Turquie, le Pakistan, l'Australie, le Canada, le Mexique et les États-Unis (Chandrashekarplus, 2015), alors que les plus grands importateurs sont, l'Inde, le Pakistan, l'Espagne, l'Algérie, le Bangladesh, l'Italie, l'Arabie Saoudite, la Jordanie et la Tunisie (AAC, 2006).

Dans le bassin méditerranéen, le pois chiche est conduit en culture pluviale, il est, généralement, du type Kabuli (Saxena, 1985). Il est cultivé dans les régions où les précipitations sont assez fréquentes dans le temps et dans l'espace avec une moyenne annuelle supérieur à 400mm (Saxena, 1987).

Tableau 2 : Production mondiale en tonnes de pois chiche durant le deux dernières années.

Pays	Production 2014	Production 2015
Australie	517000	520000
Canada	131000	115000
USA	127000	135000
Mexique	160000	160000
Türkiye	400000	500000
Pakistan	570000	610000
Inde	9530000	8280000
Autres	2065000	1680000
Total	13500000	12000000

I.1.5.2.3. Importance alimentaire du pois chiche

Le pois chiche, au même titre que la fève et les haricots, est une graine protéagineuse cultivée pour sa richesse en protéine. Il fait partie du nombre très réduit d'aliments qui apportent à la fois des protéines et un grand nombre de sels minéraux (calcium, fer, potassium et phosphore) jouant un rôle important dans l'alimentation (Anonyme, 2004).

La composition de graines mûres crues de pois chiche, contiennent par 100 g de partie comestible une énergie de 1525 Kj (364 Kcal), 11.5g d'eau, 19.3 g de protéines, 6g de lipides, 60.7g de glucides, 17.4 g de fibres alimentaires, 105mg de Calcium, 115mg de Magnésium, 366mg de Phosphore, 6.2 mg de Fer, 3.4mg de Zinc, 67UI de vitamine A, 0.48mg de Thiamine, 0.21 mg de riboflavine, 1.5 mg de niacine, 0.54mg de vitamine B₆, et 4g d'acide Ascorbique. La composition en Acides aminés essentiels, contiennent par 100g de partie comestible 185mg de Tryptophane, 1291mg de Lysine, 253mg de Méthionine, 1034mg de Phénylalanine, 716mg de Thréonine, 809mg de Valine, 1374mg de Leucine et 828mg d'isoleucine. Les principaux acides gras par 100 g de partie comestible, sont 2593 mg d'acide linoléique, 1346 mg d'acide oléique, 501mg d'acide palmitique, 101mg d'acide linoléique et 85 mg d'acide stéarique (USDA, 2004). La teneur en protéines du pois chiche, entre 20 %

et 25%, est plus faible que celle qu'on rencontre chez la plupart des autres légumes secs, mais, elle est compensée par une meilleure digestibilité. A titre de comparaison, la teneur en protéines de la viande est de 16 à 25% et celle du poisson de 14 à 20% (Anonyme, 2004).

I.1.6. Principales maladies du pois chiche en Algérie

I.1.6.1. L'Anthracnose du pois chiche (*Ascochyta rabiei*)

L'anthracnose a d'abord été signalée au Pakistan et elle touche au moins 35% de la culture de pois chiches dans le monde principalement, en Amérique latine, en Bulgarie et en Amérique du Nord (Kaiser *et al.*, 2000a ; Nene *et al.*, 1996). La maladie a été introduite en Saskatchewan, au Canada grâce à l'introduction de matériel génétique de pois chiche infecté. Aussi cette maladie a été enregistrée en Asie occidentale, en Afrique du Nord et au sud de l'Europe. La production de pois chiche est limitée par cette maladie (Nene 1982).

C'est l'une des maladies les plus graves sur la culture de pois chiche au nord d'Afrique et en l'ouest d'Asie (Kamel., 1990). Le champignon responsable de la maladie *Ascochyta rabiei* provoque l'apparition des lésions sur les feuilles, les tiges et les gousses. A l'intérieure des lésions, des écidioles forment des spores qui sortent à la faveur de l'humidité et se propagent aux plantes voisines. L'agent pathogène est transmis par les semences et les résidus. Les spores ont besoin d'au moins 24h de pluie ou d'humidité pour germer et pénétrer dans la plante. Dans la même saison. L'agent pathogène survit plusieurs années sur les résidus exposé des cultures (Kassem *et al.*, 2006).

I.1.6.2. La pourriture racinaire

Les plantules infectées par cette maladie fongique meurent et lorsqu'elles atteignent la maturité, deviennent rabougries. Chez les variétés du type Kabuli et Desi, on peut déplorer jusqu'à 30% à 90% respectivement, de pertes de rendement. On distingue deux types de pourritures : sèche et noire (Canada, 2005).

I.1.6.2.1. La pourriture sèche

D'après Rouibah (1987), cette maladie dont l'agent causal, sont plusieurs espèces du genre *Rhizoctonia spp.* débute par un dessèchement brusque de la plante, évoluant du bas de la plante vers le haut, les feuilles prennent une couleur jaune pale, alors que les racines se dessèchent et deviennent facilement cassables.

I.1.6.2.2. La pourriture noire

Selon, Nene et Reddy, (1987) et Trapero et Jimenez-Diaz (1985), ce genre de pourriture est causé par *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. Cette maladie se caractérise par des symptômes au niveau des organes aériens, tandis qu'au niveau des organes souterrains on distingue une pourriture noire sans décoloration du système vasculaire (Alvarez et Briner, 1987). Le pathogène en cause est responsable de la détérioration des semences et la mort des plantules en post émergence (Alvarez et Briner, (1987) ; Trapero et Jimenez-Diaz (1985).

I.1.6.3. La fusariose (*Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*)

Le pois chiche est attaqué par le champignon *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* (FOC), ce qui se traduit par un jaunissement suivi par un flétrissement des plantes (Nene et Reddy, 1987). Le FOC agit en obstruant les vaisseaux conducteurs du xylème et par la production de toxines qui sont transportées par le flux ascendant de la sève jusqu'aux feuilles où elles affectent la production de la chlorophylle et réduisent ainsi la photosynthèse. Les toxines agissent aussi sur la perméabilité des cellules membranaires des feuilles et perturbent ainsi la transpiration. Ceci entraîne le flétrissement des feuilles suivi par des nécroses internervaires. Cette maladie est souvent sévère dans les parcelles là où on pratique des rotations courtes avec d'autres cultures (Agrios, 2005).

I.2. Généralité sur le *Fusarium oxysporum*

Le genre *Fusarium* tire son nom du latin *fuscus* car ses spores sont en forme de fuseau, il prolifère dans le sol et sur la matière organique. Comme tous les champignons du sol, il est caractérisé par un pouvoir d'adaptation aux conditions de l'environnement très varié grâce à sa capacité de changement de formes et de fonction (El Banna *et al.*, 1984 ; Booth, 1971).

La répartition du *Fusarium* est cosmopolite, c'est un champignon a été isolé dans le pôle nord et dans le sable des déserts. On le trouve également sur les terres cultivées et dans les régions chaudes tropicales. La température idéale de sa croissance est comprise entre 20 et 25°C (Hocquet, 1984). Le *Fusarium* vit soit en saprophyte sur les déchets agricoles, participant ainsi à la biodégradation des produits industriels, soit en parasite, surtout des plantes, où il produit une pourriture des racines et une destruction des tissus (Smith et Moss, 1985). Ces infections peuvent poser des problèmes économiques considérables en cas de contamination importante des récoltes, d'autant plus que certaines espèces sont productrices de toxines potentiellement pathogènes pour l'homme et les animaux.

I.2.1. Classification et phylogénie du *Fusarium*

Le *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Emend. Snyder et Hansen, est un deutéromycète, tellurique, appartient à la sous classe des hyphomycètes, à l'ordre des Moniliales et à la famille des tuberculariacées (Nelson *et al.*, 1983 ; Booth 1971).

C'est un Deutéromycètes qui prend sur le milieu PDA (Potato Sucrose Agar) et à 25°C, il a un aspect blanc cotonneux devenant rugueux en culture plus âgée (Haware *et al.*, 1986). Les colonies sont généralement caractérisées par un mycélium aérien blanc grisâtre assez lâche, ayant l'aspect d'un cône aplati en raison d'un mycélium beaucoup plus développé dans la partie proche du végétal qu'au niveau de la zone frontale de la colonie. La pigmentation du mycélium au contact du milieu de culture est, la plupart du temps, blanchâtre pendant les premiers jours qui suivent l'isolement puis se pigmente, souvent de façon diffuse, dans la zone centrale, d'une couleur liée au vin (Tivoli, 1988).

Le *Fusarium oxysporum* est caractérisé par une production abondante de microconidies ellipsoïdales, ayant des dimensions de 4,5 - 5,5µm de long et 1,5-2,5µm de large et des macroconidies de taille variable, n'excédant généralement pas 20µm de longueur 13-20µm de long et 2-3µm de large. Ces spores sont regroupées sous forme de fausses têtes sèches à l'extrémité des microconidiophores allongés, dispersés sur le mycélium aérien, et après trois semaines de culture, de nombreuses chlamydospores intercalaires apparaissent sur le mycélium (Tivoli, 1988).

Le *Fusarium oxysporum* schlecht est un champignon cosmopolite, présente une très grande diversité génétique et écologique (Jimenez-Gasco *et al.*, 2004 ; Di-Pietro *et al.*, 2003 ; Di-Pietro, 1998). Cette espèce inclut plus d'une centaine de formes spéciales et races qui sont chacune spécifique à une plante hôte, souvent des espèces végétales d'intérêt horticole, maraicher ou agronomique. Le *F. oxysporum* inclut généralement des populations non pathogènes pour lesquelles aucune plante hôte n'a été identifiée à ce jour.

Parmi cette population, on rencontre des parasites opportunistes et des agents antagonistes (Summerbell et Schroers, 2002). Cette espèce est présente dans la plupart des sols cultivés dans le monde (Odds *et al.*, 1998). Les espèces pathogènes de *F. oxysporum* causent des maladies sérieuses sur les cultures, en causent spécialement le flétrissement vasculaire (Di-Pietro, 1998 ; Tello et Lacasa, 1990). Cette maladie attaque plusieurs plantes pérennes et annuelles, aussi bien dans les zones tempérées que dans les zones tropicales leur causant un jaunissement et un flétrissement (Di-Pietro *et al.*, 2003 ; Di-Pietro, 1998).

Les souches qui ont une gamme d'hôte identique sont assignées dans un groupe intraspécifique, nommé *formae speciale* (Armstrong et Armstrong, 1981 ; Snyder et Hansen

1940). Cette espèce comprend plus de 120 formes spéciales correspondant aux hôtes qu'elles infectent. Chacune de ces formes peut être divisée en races physiologiques et chaque race physiologique montre un modèle caractéristique de virulence sur des variétés différentielles dans la même espèce de plante hôte (Agrios, 2005 ; Armstrong et Armstrong, 1981).

I.1.2.2. Description et identification du FOC

Le *Fusarium oxysporum* peut être défini par les critères morphologiques incluant la forme des microconidies et macroconidies, la structure du conidiophore (fausse tête sur les phialides courts formés sur l'hyphe) et la formation de chlamydospores. Sur le milieu CLA (Carrot Leaf-piece Agar), les macroconidies de *F.oxysporum ciceri* sont formées en sporodochies orange-pale qui naissent à partir de monophialides sur des conidiophores branchés et parfois sur des monophialides sur l'hyphe. La longueur des macroconidies est courte à moyenne, courbée à légèrement droite, à paroi épaisse avec souvent trois septation. Les microconidies sont formés abondamment sur des monophialides courtes, ils peuvent être ovales, elliptiques ou réniformes et sont souvent sans septation (Leslie et Summerell, 2006).

Chez la plupart des isolats, les chlamydospores sont formées abondamment et rapidement (2 à 4 semaines), mais parfois peut être lentement (4 à 6 semaines) et parfois n'existent pas chez certaines isolats. Les chlamydospores sont souvent uniques ou en paires, mais peuvent être en groupe ou en petite chaîne.

Sur le milieu PDA, la morphologie des colonies varie largement, *F. oxysporum* produit un pigment sur Agar-agar, qui varie de clair au violet foncé, mais quelques isolats ne le produisent pas. Le mycélium peut être cotonneux, épars ou abondants, et varie de la couleur blanchâtre au violet. Les macroconidies sont produites (Leslie et Summerell, 2006).

I.2.3. Cycle évolutif de la maladie

L'infection primaire se fait au moyen des chlamydospores (Haware *et al.*, 1986). Leur germination dans le sol peut être inhibée par les exsudats des racines du pois chiche, phénomène qui a son importance dans la résistance de la plante à la maladie (Haware et Nene 1984). Le tube germinatif qui s'introduit à travers l'épiderme du système racinaire envahit les vaisseaux du xylème. Le développement du champignon (mycélium et conidies) obstrue ces vaisseaux, ce qui induit par conséquent un flétrissement des plantes accompagné d'une coloration des tissus vasculaires (Gupta *et al.*, 1986) (Figure 1).

L'infection s'accompagne d'une réduction de la chlorophylle et parallèlement à une augmentation des acides organiques, des polyphénols et des hydrates de carbone. Les

symptômes peuvent se manifester à deux stades de développement de la culture, ils apparaissent au stade plantule, trois semaines après le semis : les feuilles des plantes affectées montrent une flaccidité suivie d'une coloration vert terne et d'un dessèchement conduisant à la mort précoce de la plante. Il se manifeste aussi chez les plantes adultes sous forme d'un jaunissement progressif du bas en haut avec une nécrose des folioles. Il s'agit d'un flétrissement tardif appelé aussi jaunissement vasculaire. Dans les deux cas, les racines des plantes affectées gardent une apparence saine et leurs tiges montrent une coloration brune des tissus internes quand elles sont sectionnées verticalement (Haware 1988 ; Traperco-Casas et Jimenez-Diaz, 1985). Il est probable que ces deux types de symptômes soient induits par des biotopes différents de l'agent pathogène (Cabrera de la Cocha *et al.*, 1985).

Le *Fusarium oxysporum* est un parasite tellurique doué d'une vie saprophytique. Par ses organes de résistances, les chlamydo-spores, il est capable de survivre pendant plusieurs années dans les conditions les plus défavorables, en absence de la plante hôte (Kornnesdhal, 1970), pouvant même coloniser des zones profondes du sol cultivés ; c'est le cas de la forme spéciale ciceris (Haware *et al.*, 1986). Cette situation rend compte des difficultés rencontrées quand les moyens de lutte chimique sont préconisés (Figure 2).



Figure 1 : Plant de pois chiche complètement desséché. Plant récolté de l'ITGC de Sétif (photo personnelle, Abed 2015).

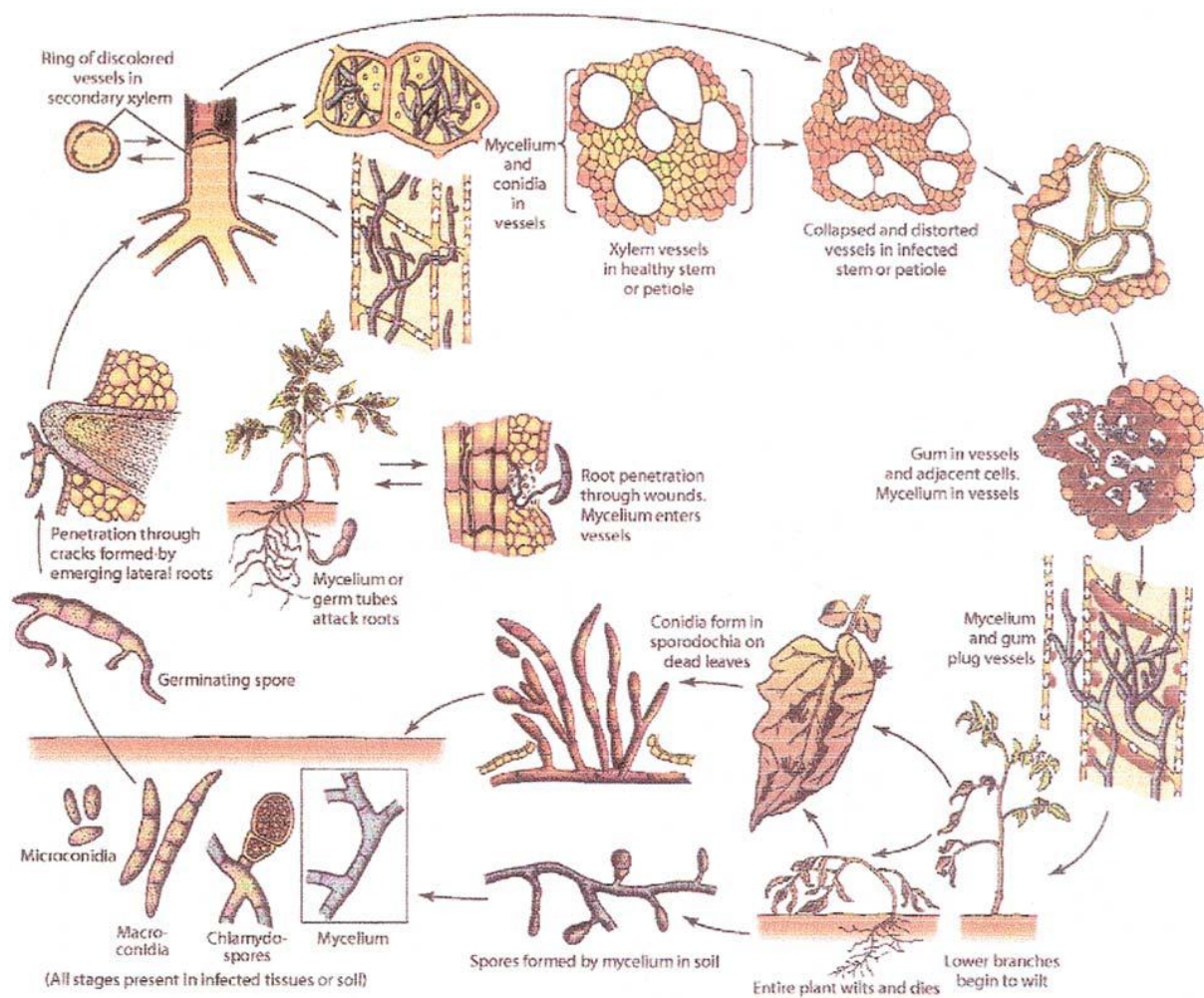


Figure 2: Cycle de vie de *Fusarium oxysporum* (Agrios, 2004).

I.2.4. La lutte contre la fusariose du pois chiche

I.2.4.1. La lutte phytosanitaire chimique

De nombreux fongicides sont disponibles pour lutter contre les champignons transmis par la semence tel que le FOC. L'enrobage, dans une certaine mesure, peut réduire la contamination des semences, par conséquent la graine bénéficie d'une protection lors de la germination ainsi que lors du début de la croissance de la plantule. Ainsi le traitement des graines de pois chiche par cinq fongicides a fait diminuer l'incidence de la maladie à un taux de 27.3% (Rocher., 2004). Egalement le test de neuf fongicide sur le FOC (Antracol, Benlate, Capton, Cobox, Dikhane M-45, Nitropentachlorobenzene (PCNB), Ridomil, Sancozeb et le Trimiltox, à différentes concentration, ont montré des efficacités variables sur l'inhibition de la croissance mycélienne (Adam, 2004).

Les fongicides qui sont souvent d'un emploi facile présentent des inconvénients tels que la perte rapide d'efficacité, le risque de résidus dans les plantes, le coût souvent trop élevé et aide à indiscipliner la microflore bénéfique du sol (Sharma et Muehlbauer, 2007).

I.2.4.2. Les méthodes culturales

Les méthodes culturales sont efficaces pour réduire l'inoculum dans le sol. La production de spores infectieuses à partir des déchets végétaux présents dans les champs est la première étape du cycle infectieux de la fusariose, il convient donc de ne pas réutiliser les déchets végétaux pour fumer les cultures (Chérif *et al.*, 2007 ; Gupta., 1991 ; Haware et Nene., 1982). Une pratique d'alternance de culture apporte des effets bénéfiques compte tenu de la prévention nécessaire des ressources du sol. De plus, elle induit une variation naturelle de la flore favorable à la résistance aux pathogènes (Chérif *et al.*, 2007 ; Gupta, 1991 ; Haware et Nene., 1982). De même pour l'utilisation des semences non infectées ou traitées pour prévenir l'infection du pois chiche durant la saison de croissance (Chérif *et al.*, 2007).

L'éradication des champignons par ces techniques ne paraît pas très efficace, car le *Fusarium oxysporum*, même en absence de plante hôte, peut survivre à l'état saprophytique dans les débris végétaux et la rhizosphère des plantes non hôtes (Booth., 1971). Le contrôle de flétrissement vasculaire du pois chiche peut être atteint par l'ajustement des dates de semis, l'avancement de la date de semis de pois chiche du début de printemps vers la fin d'hiver empêche le développement épidémique du flétrissement et minimise la sévérité de la maladie (Chérif *et al.*, 2007 ; Landa *et al.*, 2004 ; Navas-Cortés *et al.*, 2000 ; Jimenez-Diaz *et al.*, 1998 ; Jalali et Ghanda, 1998). L'ensoleillement des sols avant le semis pendant 6 semaines semble être efficace pour réduire l'incidence de la fusariose du pois chiche (Mukerji *et al.*, 2009).

I.2.4.3. Les méthodes génétiques

I.2.4.3.1. Utilisation de variétés résistantes

La lutte génétique constitue l'un des moyens les plus sûrs pour réduire l'effet de la maladie. La sélection de génotypes a permis la sélection de cultivars résistants au flétrissement et on été utilisées dans les programmes de l'ICRISAT. Les travaux de Bajwa *et al.* (2000) sur 32 génotypes de pois chiche n'ont pu sélectionner qu'une lignée résistante, les autres sont classées tolérantes ou sensibles. Dans le même centre de recherche les travaux réalisés par Gaur *et al.* (2005) ont permis d'évaluer deux cultivars avec une résistance complète et d'autre avec des résistances partielles. Les résultats ne sont pas encourageant sur le terrain du fait, d'une part des caractéristiques agronomiques indésirables de ces cultivars

sélectionnés et d'autre part de l'instabilité des caractères de résistance au flétrissement dans certaines localités (Jimenas-Gasco, 2004).

L'induction des mécanismes de défense chez le pois chiche par une application des inducteurs biologiques est une nouvelle stratégie de protection des plantes. Des études ont indiqué l'augmentation de la résistance contre la fusariose dans les semences traitées par les composées naturelles (acide salicylique, spermine) et le FOC avirulent du pois chiche (Chérif *et al.*, 2007). Les composées phénoliques contribuent à l'amélioration de la force mécanique de la paroi cellulaire de la plante hôte du pois chiche et peut aussi inhiber la croissance induite à travers l'accumulation de composées phénoliques et phytoaléxines, ainsi que l'activation des peroxydases, des polyphénoloxydases et des enzymes clés des voies des phénylpropanoïdes et des isoflavonoïdes, peut jouer un rôle crucial dans la lutte biologique et la résistance du pois chiche vis-à-vis des attaques pathogéniques (Chérif *et al.*, 2007).

I.2.4.3.2. Amélioration à partir des espèces sauvage de pois chiche

Les recherches ciblant l'amélioration de la résistance à la fusariose vasculaire (race 0) sont basées soit sur l'hybridation interspécifique par le croisement d'une espèce cultivée avec une espèce sauvage lui étant compatible, soit sur l'hybridation intraspécifique en utilisant des sources de résistance préalablement identifiées (Bouhadida, 2014). D'après Van Der Maesan (1987), 42 espèces sauvages de cicer présentent des niveaux élevés de résistance au flétrissement et également des résistances aux stress biotique et abiotique (Singh *et al.*, 1990).

Des populations de lignées recombinantes issues de ces croisements et faisant l'objet de multiplication par la méthode de sélection par filiation unipare "SSD" (Single-Seed Descent) de la F2 à la F6 ou F7, sont généralement à la base des travaux de sélection. Les marqueurs moléculaires ont été la base du criblage des gènes liés aux différentes races du *F. oxysporum*. En effet, le premier gène lié à la résistance à la race 0 de la fusariose vasculaire ainsi que les marqueurs lui étant liés ont été localisés sur la carte génétique du pois chiche par l'issu d'un travail sur deux populations de RILs issues d'un croisement intraspécifique. Par ailleurs, les gènes de résistance à la fusariose vasculaire spécifiques à la race 0 sont cartographiés sur LG2 et LG5 (Sharma et Muelhbauer 2007; Halila *et al.*, 2009).

I.2.4.4. La lutte biologique

Les avancées actuelles des recherches sur la mise au point de moyens de lutte biologique sont encourageantes. En effet, il existe dans le sol des microorganismes antagonistes naturels des agents pathogène telluriques. Actuellement huit espèces de

microorganismes sont enregistrées par l'agence Américaine de protection de l'environnement pour l'usage commercial contre les phytopathogènes du sol aux Etats-Unis (Cook et al 1996). Ceux-ci incluent deux mycètes (*Gliocladium virnes* G-21 et *Trichoderma harzianum* KRL-AG2), trois bactéries à Gram négative (*Agrobacterium radiobacter* K84, *Pseudomonas fluorescens* EG1053, et *Berholdera cepacia* type Wixonsin) et trois bactéries à Gram positive (*Bacillus subtilis* GB03, *B. subtilis* MBI 600, et *Streptomyces griseoviridis* K61, Kim. (1997).

Il a été rapporté que l'application de l'agent antagoniste *Trichoderma harzianum* avec des fongicides ont pu réduire la fréquence de 63.3% alors que les fongicides seuls ne l'ont réduite que de 29.9% (Kaur, 1992). Le traitement des graines par les espèces non pathogènes de *Fusarium oxysporum* et les formes commerciales de *Trichoderma harzianum* et *Bacillus subtilis* ont permis la réduction notable de l'incidence de la maladie. D'autres bactéries rhizosphériques du pois chiche telle que *Pseudomonas sp*, *Bacillus sp* ; *Paenibacillus sp*. inhibent la croissance du FOC et permettent une diminution de l'incidence de la maladie (Blanca et al., 1997 ; Blanca et al., 2002). D'autre part les travaux sur l'induction de défense chez l'hôte ont révélés l'efficacité des *Rhizobium spp.* et la diminution de l'incidence de la fusariose vasculaire sur le pois chiche (Blanca et al., 1997 ; Blanca et al., 2002).

I.2.4.4.1. Avantages de biopesticides

Ces biopesticides ou agents de lutte biologique, peuvent être définis comme des produits phytosanitaires dont le principe actif est un organisme vivant ou l'un de ses dérivés (Thakore, 2006). Tout comme les autres agents de lutte biologique, les biopesticides microbiens sont écologiquement beaucoup plus compatibles que les produits chimiques et ont une spécificité accrue vis-à-vis des pathogènes contre lesquels ils sont dirigés. Ils sont par conséquent moins dommageables pour les organismes non ciblés de la microflore endogène qui exerce une action bénéfique sur les plantes. De plus, les biopesticides sont souvent efficaces en faibles quantités et leurs activités protectrices peuvent relever de mécanismes multiples et déclenchent donc rarement des phénomènes de résistance chez le pathogène à cause d'une faible pression de sélection. En outre, ils peuvent compléter les pesticides conventionnels une fois utilisés dans les programmes intégrés de la gestion des parasites (IPM) (Thakore 2006 ; Fravel 2005). Par exemple, l'intégration du contrôle biologique avec des fongicides, les pratiques culturales, et d'autres mesures peuvent contribuer au contrôle de la rouille sur la tomate (Thakore 2006 ; Fravel 2005).

Les biopesticides peuvent donc être complémentaires au traitement chimique, mais peuvent aussi être utilisés dans des situations pour lesquelles aucune solution de contrôle

utilisant des produits de synthèse n'est actuellement disponible. Ces agents microbiens sont utilisés à travers le monde dans les champs et dans les serres (Saravanakumar *et al.*, 2007 ; Ji *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006), pour combattre un grand nombre de maladies causées par des pathogènes du sol, foliaires ou de post-récoltes. Ces produits ont été développés pour contrôler de multiples maladies sur diverses céréales, légumes, fruits et fleurs (Paulitz et Bélanger, 2001; Fravel 2005).

I.2.4.4.2. Inconvénient des biopesticides

Malgré les avantages de ces agents biologiques, le marché des biopesticides reste toujours limité à cause de certaines contraintes : premièrement, l'effet protecteur est parfois insuffisant par rapport aux produits chimiques ou n'est parfois pas constant, dépendant notamment des conditions du milieu (température, sol, humidité, plante hôte, pH, etc...) Larkin et Fravel, 2002). Deuxièmement, le coût et le délai sont très élevés pour l'enregistrement en Europe, de même que le coût de la production est élevé pour la plupart des agents de biocontrôle. Troisièmement, le conditionnement et la formulation sont très difficiles pour des espèces non sporulantes et même parfois pour les espèces sporulantes (Hjeljord *et al.*, 2000; Collins et Jacobsen, 2003). D'autre part, les pesticides chimiques peuvent offrir rapidement une activité beaucoup plus efficace, tandis que les biopesticides peuvent avoir besoin de temps après leur application pour commencer à agir. Il est important de se rappeler que la plupart des biopesticides sont composés d'organismes vivants qui ont un spectre relativement restreint de ravageurs cibles.

I.3. Les rhizobactéries antagonistes

I.3.1. Le genre *Bacillus*

Le genre du *Bacillus* constitue un groupe d'organisme d'une extrême variété, comprend des bactéries en forme de bâtonnets, généralement mobiles, sporogènes dans des conditions défavorables et en présence d'oxygène (Prescott, 2002). Chimiohétérotrophique, ils incluent des aérobies, des anaérobies facultatifs et des anaérobies, avec une vaste diversité d'exigences de croissance, quelques souches sont thermophiles et se développent bien de 65°C à 75°C (Talaro et Talaro, 2002). Différentes activités biochimiques sont notées incluant des activités de fermentation et de respiration. Certaines espèces de *Bacillus* produisent des enzymes extracellulaires hydrolytiques qui décomposent des protéines, acides nucléiques, polysaccharides et lipides. Certaines de ces enzymes sont produites commercialement en grandes quantités : les enzymes protéolytiques sont employées dans des détergents de

blanchisserie et les enzymes hydrolytiques de polysaccharides sont employées dans la dégradation de l'amidon. Certains sont pathogènes d'insecte, le cas de *Bacillus thuringiensis*, seule bactérie exploitée à grande échelle comme bio-insecticide (Prescott, 2002).

I.3.1.1. Classification et phylogénie des *Bacillus*

Les premières classifications du genre *Bacillus* se basèrent sur deux caractères : la croissance en aérobie et la production des endospores. Mais de ces caractères, il en découla que plusieurs bactéries possèdent différents types physiologiques et occupant différents habitats comme ils peuvent être groupés ensemble. Donc l'hétérogénéité physiologique, écologique et génétique rendait difficile la caractérisation du genre *Bacillus* (Todar, 2008).

Dans la première édition du Bergey's Manual de la systématique bactérienne (1986), le pourcentage de G+C des espèces de *Bacillus* connues varie entre 32 à 69% montrant ainsi une hétérogénéité génétique de ce genre. Le contenu de G+C peut varier entre les souches de la même espèce par exemple, le contenu G+C des souches de *Bacillus megaterium* est étendue entre 36 à 45% (Slepecky et Hemphill, 2006).

Dans la deuxième édition de Bergey's Manual (2004), la séparation des plus importants types de bactéries endosporulées dans deux classes différentes dans le phylum des *Firmicute*, à savoir *Clostridia* et *Bacilli*. *Clostridia* comprend l'ordre des *Clostridiales* et la famille des *Clostridiaceae* avec 11 genres, incluant *Clostridium*. *Bacilli* contient l'ordre des *Bacillales* et la famille des *Bacillaceae*. Dans cette famille, il y a 37 nouveaux genres à côté des *Bacillus*. L'hierarchie taxonomique de *Bacillus* (Bergey's 2004) est la suivante:

Domain: *Bacteria*

Division: *Firmicutes*

Class: *Bacilli*

Order: *Bacillales*

Family: *Bacillaceae*

Genre: *Bacillus* (Todar, 2008).

I.3.1.2. Taxonomie moderne des *Bacillus*

Le séquençage du 16 DNAr ait été particulièrement puissant pour la classification taxonomique dans un cadre évolutionnaire, il a également une certaine issue principale avec la classification phénotypique. Selon cette technique, on peut diviser le genre *Bacillus* en deux groupes, le groupe de *B. subtilis* et le groupe de *B. cereus*.

Les espèces formant le groupe de *B. subtilis* sont étroitement liés et ainsi pas facilement distinguables. Les cellules de ces espèces ont moins d'un mm de large, les sporangia sont ellipsoïdes. Elles sont en général mésophiles et neutrophiles en ce qui concerne le pH pour la croissance. Parmi ces espèces on a : *B. licheniformis* de *B. pumilus*, de *B. subtilis*, de *B. sonorensis*, *B. firmus*, de *B. lentus*,...etc (Heather Maughan, 2011) (figure 3).

Le deuxième groupe, celui *B. cereus*, renferme des membres facilement distinguables. Les cellules de ces organismes sont plus larges qu'un mm, les sporangia ne sont pas gonflés, et les spores sont ellipsoïdes. Elles sont en général mésophiles et neutrophiles. Les dispositifs classiques pour distinguer ce groupe sont : l'incapacité de produire l'acide à partir du mannitol et la production de lécithines. Parmi les espèces de ce groupe on trouve : *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoide*, *B. thuriengiensis* (Fritze, 2004). La classification la plus fréquente est basée sur la morphologie de *Bacillus* :

- Bacillus à spore ovale central ou terminale ne déforme pas la cellule mère. parmi ces espèces on trouve : *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycoide*, *B. thuringiensis* et *B. weihenstephanensis* (Avril et al, 1992).
- Bacillus à spore ovale centrale ou subterminale, déformant la cellule mère, ex : *Bacillus circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. alvei*, *B. brevis*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *Bacillus macerans*, *B. pumilus*, *B. subtilis* (Avril et al, 1992).
- Bacillus à spore sphérique terminale ou subterminale déformant la cellule mère, ex : *B. globisporus*, *B. insolitus*, *B. sphaericus*.

Dans ce genre bactérien, certaines espèces produisant des toxines létales pour les insectes sont utilisées comme des biopesticides l'exemple de *Bacillus thuringiensis*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Paenibacillus popilliae*, *Brevibacillus laterosporus* (Avril et al, 1992).

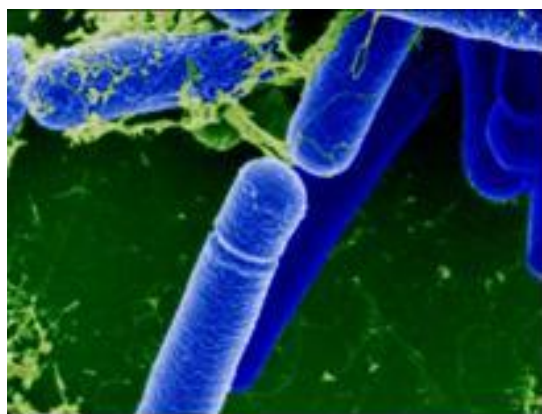


Figure 3: La bactérie *Bacillus subtilis* vue sous microscope électronique (Abou Assef, 2006)

I.3.1.3. Principaux caractères des *Bacillus*

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles rectilignes, à extrémité carrées ou arrondies, de taille variable (0,5x1,2 mm jusqu'à 2,5x10mm), sporulés, chimioorganotrophes à Gram positive ou à Gram variable (la coloration de Gram n'est positive que dans les très jeunes cultures). Généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche (sauf *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*). Les *Bacillus* sont rarement capsulés, sauf *B. anthracis*, aérobie ou aéro-anaérobies facultatives. Il y a une extrême variabilité de ce genre bactérien, thermophiles, psychrophiles, acidophiles, halophiles, alkalophiles, la plupart de ces espèces ont été isolé à partir du sol, des eaux, des aliments contaminés. Toutes les espèces de *Bacillus* ne sont pas pathogènes sauf *B. thuriengiensis* ; *B. cereus* ; *B. anthracis* (Prescott's, 2002).

La gélose sans peptone est le milieu le plus favorable à la sporulation. L'aspect des colonies obtenues sur milieu gélosé est extrêmement variable et les phénomènes de dissociation sont fréquents.

La spore mûre est ovale ou ronde, son diamètre est inférieur ou supérieur à celui du bacille. Sa localisation est centrale, paracentrale, subterminale ou terminale. Dans certaines espèces, il existe des inclusions parasporales, parfois on note la présence des cristaux de protéines. La résistance aux agents physico-chimiques est faible pour les formes bacillaires, facilement tuées par la chaleur (1 h à 55°C) et les antiseptiques. Elle est plus élevée pour les spores (40 mn à 120°C). *B. subtilis* compte parmi les plus résistants (Euzéby, 2007).

La plupart des espèces sont mésophiles, avec l'optimum température entre 30 et 45°C, d'autre sont thermophiles et la température optimum est plus de 65°C. Par contre il y a des espèces psychrophile, sont capable de croître et sporuler à 0°C. La gamme de pH de croissance est entre 2-11. Dans le laboratoire et sous les conditions optimales de croissance, le temps de génération des espèces de *Bacillus* est environ 25 minutes. La plupart des espèces de *Bacillus* peuvent croître sur des milieux simples comme l'agar nutritif (Todar, 2008).

Les milieux de culture usuels permettent la croissance de la plupart des espèces du genre *Bacillus*. La culture de ces germes peut s'avérer difficile car certaines espèces exigent de nombreux facteurs croissance. Les milieux favorables ou hostiles utiles pour l'identification sont : gélose nutritive à pH 6, bouillon hypersalé, les espèces de *Bacillus* ont besoin de vitamines souvent apporté avec l'extrait de levure (Avril et al, 1992). Il y a des espèces qui utilisent le sel d'ammonium comme source d'azote dans le sol. Parmi les espèces fixatrice de l'azote on trouve : *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. azotoformans*, *B. sphaericus*, *B. cereus*, qui peuvent affecter les espèces végétales légumières pour former les nodosités, et la fixation de l'azote se fait par Bradyrhizobia. (Euzéby, 2007).

Lorsque les conditions deviennent défavorables, les *Bacillus* donnent des spores souvent très résistantes dans le milieu extérieur. La sporulation *in vitro* dépend des conditions de culture et certaines espèces ne sporulent que dans des milieux spéciaux (Euzéby, 2007).

I.3.1.4. Caractéristique métabolique des *Bacillus*

La plupart des espèces de *Bacillus* sont chimioorganotrophes, leur énergie est obtenue par l'oxydation des composants organiques. Il existe des espèces thermophiles autotrophes facultatives, le cas de *B. schlegeli* utilisant le carbone monoxyde et le carbone dioxyde comme source de carbone (Anonyme, 2009). D'autres espèces sont auxotrophes et ont besoin de vitamines et d'acides aminés dans leur milieu, telles que *B. sphaericus*, *B. cereus*.

Généralement le test de catalase est positif (+), tandis que le test oxydase varie entre le positif (+) et le négatif (-) suivant les espèces aérobies strictes ou anaérobies facultatives, la respiration incomplète comme le cas de *B. subtilis* qui est considéré comme une bactérie anaérobie facultative utilisant le nitrate comme accepteur final des électrons par l'intervention de la nitrate réductase, l'acidification des sucres en absence de l'accepteur final des électrons, par exemple: *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*...etc., réalisent la fermentation des carbohydrates et donnent des acides mixtes : acetate, éthanol, lactate, 2-3-butanediolacetoin (Sullivan, 2005).

En ce qui concerne le métabolisme et la biochimie des espèces de *Bacillus*, ils sont liés à *Bacillus subtilis* ou à des comparaisons avec cette espèce. On établit maintenant que *Bacillus subtilis*, qui était considérée comme aérobie stricte depuis longtemps, capable de croître dans des conditions anaérobies, non seulement avec du nitrate comme accepteur d'électron mais également par la fermentation en l'absence des accepteurs d'électron. Cette espèce et ses parents étroits apparemment ne peuvent pas employer d'autres accepteurs d'électron comme le sulfoxyde, le fumarate et la triméthylamine diméthylés l'N-oxyde, et ont été considérées comme ayant une position intermédiaire entre les véritables anaérobies facultatifs maintenant assignées à *Paenibacillus* et le groupe de *Bacillus sphaericus* aérobies (Priest, 1989), qui sont strictement oxydants. *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus thuringiensis* peuvent fermenter des hydrates de carbone en l'absence des accepteurs exogènes d'électron, et beaucoup d'espèces de *Bacillus* peuvent employer le nitrate comme accepteur d'électron en l'absence d'oxygène, mais plusieurs espèces telles que *Bacillus megaterium* et *Bacillus pumilus* ne peuvent pas faire ceci. (Nakano et Zuber, 2002).

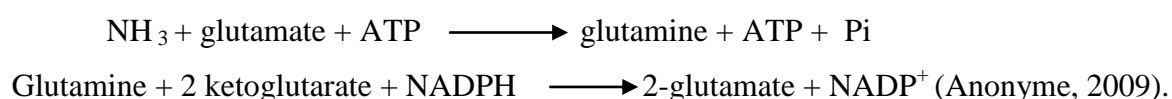
L'habitat normal des espèces de *Bacillus* est le sol, qui contient un éventail d'hydrates de carbone et de polysaccharides des microorganismes, des plantes et des animaux, et ainsi lui

peuvent utiliser un éventail de tels substrats et possède un grand nombre d'enzymes ce qui dégradent des polysaccharides (Parvathi et *al.*, 2009). Ces espèces hydrolysent l'amidon, la caséine, la gélatine et la lécithine grâce à la production des enzymes extracellulaire chitinase, protéase, la phosphatase alcaline, la gélatinase et la lipase (Smibert et Krieg, 1994).

Plusieurs *Bacillus* peuvent synthétiser et excréter l' α -amylase, c'est une enzyme thermostable à 100°C pendant 1h, qui clive le lien α -1,4 joignant les monomères de glucose dans l'amidon. D'autres synthétisent aussi des protéases telles que la caséinase, qui clive le lien peptidique joignant les monomères d'acides aminés. Les lipides peuvent être réduits en acides gras simples par les lipases. Enfin, l'ADNase clive les liens phosphodiesteres entre les nucléotides d'une chaîne polynucléotidique. (Smibert et Krieg, 1994).

Bacillus subtilis peut employer l'ammonium, nitrate, acides aminés, quelques purines, urée, acide urique, et peptides comme sources d'azote. La glutamine, suivie de l'arginine, est la meilleure source pour la croissance rapide. Bien que *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* et *Bacillus halodurans* ont de larges similitudes dans leurs métabolismes, *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus* ont de plus grandes capacités pour l'utilisation des acides aminés et des peptides. (Outtrup et Jørgensen, 2002).

L'ammonium, glutamate et la glutamine sont les sources les plus utilisés par les espèces de *Bacillus*, selon deux réactions. La première réaction se fait suite à l'intervention de la glutamine synthétase qui introduit NH_3 dans le glutamate pour donner la glutamine. La deuxième réaction se fait suite à l'intervention du glutamate déshydrogénase.



I.3.1.5. Distribution écologique des *Bacillus*

Généralement le sol est le milieu écologique de *Bacillus*, là où ils jouent un rôle dans les cycles du carbone et de l'azote. La résistance des spores et la diversité physiologique des formes végétatives en font des bactéries très ubiquistes que l'on peut isoler du sol, l'eau de mer, de l'eau douce ou de denrées alimentaires (Todar, 2008).

La plupart des espèces de *Bacillus* sont saprophytes (sur les résidus des plantes par la sécrétion des exoenzymes comme les carbohydrases, et les protéases ces enzymes permettent la dégradation de cellulose, l'amidon, glucane, pectine, et les protéines. La plupart des espèces qu'on trouve dans le sol sont : *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. sphaericus*, *B. licheniformis*. Alors que il ya des espèces qui sont pathogènes à l'homme, animaux, et les insectes. Les espèces de *Bacillus* sont très nombreuses dans les sols agricoles, renfermant

entre 10^7 - 10^8 /g tandis que les sols pauvres contiennent 10^3 /g (Seldin *et al.*, 1998).

Les *Bacillus* se rencontrent aussi sur les sols acides, basiques et neutres, riches ou pauvres en matière organique. Cette grande diversité revient à la haute résistance des spores, aux facteurs physicochimiques, tels que la température, la dessiccation, les radiations, les antibiotiques,...etc. (Garbeva *et al.*, 2003).

I.3.1.6. *Bacillus* comme agents de biocontrôle

Les biopesticides, à base de bactéries représentent la majorité des biopesticides microbiens (Shoresh *et al.*, 2010). Le genre *Bacillus* est le genre bactérien le plus étudié dans la recherche scientifique et le plus utilisé en agriculture. En effet, le US Food and Drug Administration (USFDA) a confirmé que toutes les espèces qu'englobe le groupe *Bacillus subtilis* sont non pathogènes à l'homme. En plus, le genre *Bacillus* possède la possibilité de se sporuler dans des conditions défavorables ce qui facilite sa production industrielle et sa formulation en un produit stable (Harwood et Wipat, 1996; Lolloo *et al.*, 2010). Le tableau 3 résume l'ensemble des souches de *Bacillus* commercialisées dans le monde comme biofertilisants et agents de biocontrôle (Schisler *et al.*, 2004).

Tableau 3 : Produits commerciaux de biocontrôle à base de *Bacillus* (Schisler *et al.*, 2004).

Souches bactériennes	Produit Commercial	Cible primaire
<i>B. subtilis</i> QST713	Serenade	Mycètes et bactéries sur les légumes et les fruits
<i>B. licheniformis</i>	Ecoguard	Mycètes sur le gazon
<i>B. subtilis</i> GB03	Kodiak	Mycètes sur des haricots, coton et de soja
<i>B. pumilis</i> GB34	Yield shield	Mycètes sur de soja
<i>B. amyloliquefasciens</i>	Bioyield	Mycètes sur les plantes annuelle
<i>B. subtilis</i> MB1600	Subtilex	Mycètes sur le coton et le soja
<i>B. subtilis</i> MB 1600	Hi stick	Mycètes sur le soja

Les espèces de *Bacillus* agissent sur les microorganismes phytopathogènes à travers la production d'enzymes et des antibiotiques, surtout quand les cellules sont en phase stationnaire du cycle de croissance. C'est probablement une stratégie pour limiter la concurrence bactérienne pour les sources d'énergie libérées par la dégradation macromoléculaire des enzymes de balayage (Okulate, 2009). Le nombre d'antibiotiques produits par le genre bacille est 167, dont 66 antibiotiques sont composés de peptides élaborés

par des souches de *B. subtilis*, et 23 sont des produits du *Brevisbacillus*. La Polymyxine et la colistine leur sont étroitement liées ; la Bacitracine, le complexe de Tyrothricine et la Gramicidine S sont contre les bactéries à Gram positives, cependant, des composés tels que la Polymyxine, la Colistine, et la Circuline ont une activité presque exclusive sur les bactéries à Gram négative, tandis que la Bacillomycine, la Mycobacilline et la Fungistatine sont des agents efficaces contre les moisissures et les levures (Fernandes *et al.*, 2007).

Le *Bacillus subtilis* produit également plusieurs autres antibiotiques : la Subtiline 32, un résidu de peptide; la Bacilyline, un dipeptide ; la Subsporins A-C, un lipooligopeptides ; et la Rhizocitine A-D, un phosphooligopeptides, l'Iturine (Okulate, 2009). La Surfactine, un lipopeptide antibiotique qui est synthétisé par plusieurs espèces de *Bacillus*. *B. Licheniformis* et *Bacillus subtilis* sont les producteurs potentiels de la Surfactine (Marchadier, 2009). Des variantes peptidiques de la Surfactine, de la Lichenysine et de la Pumilacidine, ont été également isolées dans *B. licheniformis* et *B. pumilus*, respectivement. (Wei et Chu 2002).

Il y a des Souches de *B. megaterium* produisent plusieurs bactériocines actives contre d'autres souches de *B. megaterium* (Fernandes *et al.*, 2007). *Brevibacillus laterosporus* précédemment classifiés comme *Bacillus laterosporus*, peut produire différents facteurs de virulence : parasporal cristalline et protéase extracellulaire (Huang *et al.*, 2005) et des antibiotiques lipopeptidiques (Desjardine *et al.*, 2007). En plus, le *B. laterosporus* sécrète également des petits peptides avec un large spectre antibiotiques, tels que la Loloatine A. *Bacillus cereus* accumule deux antibiotiques, Zwittermicine A et Kanosamine, dans le surnageant de sa culture (Sadfi *et al.* (2002).

Les espèces de *Bacillus* se sont montrées très intéressantes pour contrôler un éventail de mycètes qui causent l'affaiblissement, fonctionnant en tant qu'antagoniste pour la croissance des pathogènes par la production des enzymes cela dégradent les polymères structuraux fongiques (par exemple chitinase, c'est le cas de *B. laterosporus* MML2270 a été à l'origine isolé dans la rhizosphère de riz. Cette bactérie a pu être un candidat idéal pour le control biologique des champignons pathogènes du riz (Daou, 2008); 1.3 glucanase), et les antifongiques volatiles (Knox *et al.*, 2000). Dans quelques situations, les composés organiques volatiles (VOCs) sécrétés par *B. subtilis* ont stimulé la croissance des plantes et à l'induction de mécanismes systémiques de résistance des plantes (Compant *et al.*, 2005).

Les plantes créent un environnement nutritionnel et physicochimique spécifique pour le développement des microorganismes dans la rhizosphere (Bais *et al.*, 2006). La colonisation des racines par les *Bacillus* est un processus complexe dans lequel les lipopeptides peuvent intervenir à différents niveaux. L'attachement et l'agrégation des

microcolonies sous forme de bio-film est à la base du phénomène de colonisation (Ramey *et al.*, 2004) et la formation des pellicules dans l'interface eau-air (Peypoux *et al.*, 1999; Kinsinger *et al.*, 2003). Bais et ses collaborateurs (2004) ont mis en évidence le rôle des surfactines dans la formation d'un biofilm stable, de la souche *B. subtilis* 6051 sur les racines d'*Arabidopsis*. La suppression de l'expression des surfactines dans cette souche diminue le taux de colonisation et le biocontrôle de la maladie causée par *Pseudomonas syringae* (Ahimou *et al.*, 2000). Les colonies bactériennes se déplacent sur la racine pour atteindre la niche la plus riche en nutriments. Ceci s'effectue par le phénomène de «swarming», il s'agit d'un mouvement guidé par les flagelles, il permet aux bactéries de se déplacer sous forme de bio-film tout au long de la surface des racines. Ce mouvement dépend principalement de la production des biosurfactants (Raaijmakers *et al.*, 2006; Daniels *et al.*, 2004). Il a été récemment démontré que les surfactines et les mycosubtilines fonctionnent comme des agents mouillants, en réduisant la tension de surface (Leclere *et al.*, 2006). Dans ce contexte, les études ont montré le rôle des surfactines et non pas des fengycines ou des iturines dans la formation de biofilm sur des racines des plantes près les bactéries rend les plantes moins sensible à l'infection (Bais *et al.*, 2004).

La concurrence pour l'espace et des aliments de croissance est un autre facteur important. La synthèse d'acide salicylique près les bactéries peuvent rendre les plantes plus tolérante aux parasites et aux microbes pathogènes près résistance acquise systémique stimulante (SAR), un programme de défense commun induit aux plantes pour combattre les microbes pathogènes (Kloepper *et al.*, 2004 ; van Loon *et al.*, 1998). L'induction de la résistance systémique induite (ISR) à l'usine est une autre manière qui des bactéries peut protéger les plantes (van Loon *et al.*, 1998).

Certaines espèces comme *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* et *B. amyloliquefaciens* se sont avérées des antagonistes efficaces contre *Phytophthora palmivora*, un agent causal de putréfaction de bourgeon de noix de coco (Jayasuja et Iyer, 2003). *Bacillus pumilus* TR 24 et *Bacillus sp.* TR16) isolés à partir de la rhizosphère des plantes de thé sont avérés antagoniques in vitro contre trois microbes pathogènes fongiques à savoir, *Fomes lamaoensis*, *Poria hypobrumea* et *Sphaerostilbe repens*, causant la putréfaction brune de racine. *Bacillus cereus*, particulièrement la souche *B. cereus* UW85, fournit un biocontrôle efficace des maladies de fontes de semis des légumineuses (Agrios, 2005). *Bacillus megaterium* KL39, un agent de biocontrôle de la rouille du poivre rouge, en produisant un actif antibiotique antifongique contre une large gamme de mycètes pathogènes des plantes (Jung et Kim, 2003).

I.3.2. Le genre *Pseudomonas*

I.3.2.1. Principaux caractères des *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* appartiennent au phylum des *Protéobacteria*, classe des *Gammaprotéobacteria*, ordre des *Pseudomonales*. Ce sont des bacilles à Gram négative, droits et fins, aux extrémités arrondies, d'une taille moyenne de 2 sur 0.5 µm (Palleroni, 1984, Rossinol, 2007). Ces bactéries sont mobiles grâce à une ciliature polaire monotriche, lophotriche, ou multitriche, aucune spore n'est produite. Ces attributs morphologiques définissent les *Pseudomonas* mais l'admission au genre *Pseudomonas* exige quelques propriétés physiologiques additionnelles, telles que le métabolisme énergétique purement respiratoire et la nutrition de type chémoorganotrophique (Figure 4) (Rossinol, 2007).

Les *Pseudomonas* se cultivent sur des milieux usuels non enrichis et sont capables d'utiliser de nombreux substrats hydrocarbonés et d'énergie (Rossinol, 2007). Ces propriétés ainsi que l'occurrence répandue, déterminent la grande importance de ces organismes comme des participants au cycle de carbone dans la nature (Palleroni et al., (1973).

Depuis la création du nom générique *Pseudomonas* par Migula (1894) au début du 20^{ème} siècle, beaucoup de noms d'espèces ont été assignés au genre (Palleroni, (1993). Actuellement, le genre est réduit à une fraction d'espèces, bien que la 2^{ème} édition de Bergy's Manual of Systematic Bacteriology inclut la description de 61 espèces (Palleroni, (2005).

Les espèces ont une composition basse en ADN, s'étend de 57 à la guanine et de 69 mo l% plus de cytosine (C+G). Aucune discontinuité interne dans cette gamme n'est utile pour la séparation des catégories sub-génériques (Palleroni, (2005).

La production des colorants était une caractéristique d'importance primaire au niveau générique, des colorants diffusibles qui entrent en fluorescence sous le rayonnement (UV) de la longueur d'onde courte (254 nm). Communément s'appellent (les colorant fluorescents) et caractérisent l'espèce qui sont maintenant placée dans le prétendu groupe fluorescence sous le rayonnement UV de longueur d'onde (350nm). (Palleroni, (1984).



Figure 4. *Pseudomonas* sp observé sous microscope électronique. (Abou assef, 1996).

I.3.2.2. Caractéristiques métabolique des *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* est caractérisé par un métabolisme oxydatif et non fermentatif, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons, et même quelques souches utilisent la dénitrification (les nitrates sont parfois utilisés comme accepteur d'électron ce qui permet une croissance en anaérobiose).

Les *Pseudomonas* fluorescents saprophytes possèdent tous un cytochrome oxydase C ayant un maximum d'absorption caractéristique à 552 /554 nm, qui peut être mise en évidence par l'oxalate de N, N-diméthyl-paraphénylène-diamine (Lelliot *et al.*, 1996). Elles sont aussi catalase positive, mésophiles, chimioorganotrophes puis qu'elles peuvent croître dans un milieu minéral ne contenant qu'une seule source de carbone. Toutefois, certains sont chimioorganotrophes facultatifs et peuvent utiliser l'hydrogène comme source d'énergie et n'ont pas besoin de facteurs de croissance pour se multiplier. Elles peuvent utiliser des sources de carbones variables (versatilité nutritionnelle), et certaines ont la capacité de croître même dans l'eau (Stanier *et al.*, 1996). La plupart étant saprophytes (Ramalho *et al.*., 2002 ; Bossis *et al.*, 2000). Quelques espèces comme *P. syringea*, sont phytopathogènes (Stanier *et al.*, 1966), et certaines peuvent causer des infections chez l'homme. Particulièrement *P. aeruginosa*, reconnue comme pathogène opportuniste et causant des infections pulmonaires mortelles chez les patients atteints de fibrose kystique (Mavrodi *et al.*, 2001).

Ces bactéries ont la capacité de dégrader des composés complexes, tels que les protéines et les polysaccharides complexes comme l'amidon, la cellulose (Palleroni, 1984), certaines seulement comme *P.pseudoalcaligenes* peuvent dégrader le poly B-Hydroxybutyrate (Palleroni, 1993). L'aptitude de certains isolats à dégrader des substances xénobiotiques a également retenu l'attention de différents chercheurs (Bossis *et al.*, 2000). De nombreux isolats de *P.fluorescens* et *P.putida* ont été cités en exemple comme des souches capables de

dégrader des molécules aromatiques plus ou moins complexes. L'assimilation de composés aromatiques semble par contre moins courante chez les isolats provenant de sols non contaminés ou de la rhizosphère (Latour *et al.*, 1996 ; Campbell *et al.*, 1995).

Le catabolisme des xénobiotiques par les *Pseudomonas* spp fluorescents se caractérise en effet par la variété et la plurifonctionnalité des enzymes dégradatives. Il présente de multiples voies périphériques permettant les premières attaques d'une gamme importante de composés (Golovleva *et al.*, 1992). Enfin, certaines populations de *Pseudomonas* spp ont la possibilité de dissimiler l'azote (Clays-Josserand *et al.*, 1995). Cette dissimilation est plus ou moins complète selon le groupe taxinomique considéré (Matsubara et Zumft, 1982).

Ces bactéries contribuent significativement, à la réduction des nitrates et des nitrites, polluants des nappes phréatiques (Latour et Lemanceau, 1997). En raison de la richesse de leurs voies métaboliques, elles sont souvent capables de résister à de nombreux antiseptiques ou antibiotiques ce qui explique leur présence de plus en plus fréquente en milieu hospitalier où elles peuvent être isolées de l'environnement humide (Euzeby, 2008).

Les *Pseudomonas* produisent une couche d'exopoly-saccharide entourant leurs cellules, la protégeant de la phagocytose par les macrophages chez les mammifères. Cette couche d'exo-polysaccharide (E.P.S) leur permet de former des bio-films, nécessaire à l'adhésion aux surfaces, de telle manière qu'il est difficile de les déloger (Visca *et al.*, 2007). Ce genre produit des poly hydroxy-alcanoates et d'alginate ainsi que d'autres substances métaboliques, ce qui les rend d'un grand intérêt biotechnologique (Holloway, 1992).

I.3.2.3. Classification et phylogénie des *Pseudomonas*

L'étude de la composition en bases du génome et la recherche d'homologies de séquences génomiques par hybridation ADN/ADN et ADN/ARN, ainsi que le séquençage de marqueurs taxonomiques tel l'ADN codant l'ARN_r 16S (Anzai *et al.*, 2000). Ont conduit à une évolution de la taxonomie au sein du group des *Pseudomonas* et genre apparentés. Ainsi, en 1984, Palleroni *et al.* ont montré que le genre était génétiquement hétérogène avec l'existence de cinq groupes d'ARN distincts.

Le genre *Pseudomonas sensu stricto* correspond aux groupes d'ARN I et comprend actuellement plus d'une centaines d'espèces différentes. Les autres espèces *Pseudomonas sensu lato* (groupes ARN II à V) ont été reclassées dans d'autres genres, cette réorganisation a permis une distinction marquée entre le genre *Pseudomonas* et les genres apparentés regroupant *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Brevundimonas*,

Burkholderia, *Chryseomonas*, *Comamonas*, *Flavimonas*, *Flavobacterium*, *Ralstonia*, *Shewanella*, *Sphingobacterium*, et *Stenotrophomonas* (Kersters *et al.*, 1996).

Le genre *Pseudomonas sensu stricto* est communément divisé en deux groupes : les *Pseudomonas spp.* fluorescents (par ex : *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. syringae*) et les *Pseudomonas spp.* non fluorescents (par ex : *P. alcaligenes*, *P. fragi* et *P. sutzeri*). Cette distinction, qui n'a pas de valeur taxonomique officielle, correspond à la capacité ou non de produire un sidérophore spécifique, la pyoverdine (Rossinol, 2007). Les pyoverdines sont des pigments diffusibles qui entrent en fluorescence sous le rayonnement (UV) de la longueur d'onde courte (254 nm) collectivement s'appellent les colorants fluorescents, quelque colorant soluble de phénazine entre en fluorescence sous le rayonnement UV de longueur d'onde (350nm). Une distinction importante en ce qui concerne les colorants fluorescents vrais (Rossinol, 2007).

Les pyoverdines sont solubles dans l'eau et insolubles dans le chloroforme. Elles jouent un rôle physiologique important car ce sont de puissants sidérophores. Elles sont constituées d'un chromophore quinoléique associé à des peptides dont la taille et la composition en acides aminés sont variables. La synthèse des pyoverdines dépend de la quantité de fer (Fe^{+3}) disponible dans le milieu de croissance et des besoins de la bactérie. Les pyoverdines sont ainsi synthétisées lorsque la concentration en fer libre dans le milieu est trop faible pour permettre la croissance bactérienne.

L'espèce de *P. fluorescens* compte parmi les espèces qui présentent une forte hétérogénéité phénotypique et génotypique. En 2000, Bossis *et al.* ont rassemblé des informations concernant les différentes études taxonomiques entreprises au sein de l'espèce *P. fluorescens*. Cette espèce comprend maintenant 5 biovars dont l'appartenance repose sur l'assimilation de différents éléments carbonés. L'utilisation de clés dichotomiques (Bossis *et al.*, 2000), ainsi que le sidérotypage permettent de déterminer avec précision l'appartenance d'une souche bactérienne à un biovar donné.

Les pourcentages d'hybridation ADN/ADN entre souches de la même espèce, et dans certains cas du même biovar, sont fréquemment inférieurs à 50%. La diversité génomique apparaît plus grande que la diversité physiologique (Gianrd *et al.*, 1997).

I.3.2.4. Distribution écologique des *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* se trouvent dans différents habitats parce que leurs conditions alimentaires sont simples, et vu que leur polyvalence métabolique est extrême. Cependant,

leur capacité d'occuper un certain habitat est limité par des extrémités du pH (toute les deux alcaline ou acide) et elles ne sont pas thermophile (Palleroni, 1992).

L'eau est un habitat commun des *Pseudomonas*. Elles n'exigent pas les vitamines et bon nombre d'entre elles peuvent se développer dans des conditions oligotrophiques, même dans l'eau pure, l'eau minérale (Rosenberg, 1990).

Dans une étude taxonomique numérique plus ancienne de bactéries de pétrole, dégradantes en eaux côtières et sédiment marine, membres du genre on a rapporté que les *Pseudomonas* sont abondants (Deley, 1992).

D'autre sont des bactéries associées aux racines, et on été isolés de différentes plantes *P.brassicacearum* et *P.thivervalensis* isolés respectivement de plantes d'ail et de riz (Achouak *et al.*, 2000). *P.rhizosphaerae*, *P.lutea* ; et *P.argentinensis* isolé de la rhizosphère de l'herbe (Peix *et al.*, 2003). Certaines ont été isolées de la phylosphère des plantes, c'est le cas de *P.lurida* (Behrendt *et al.*, 2007). Quelques espèces ont été isolées d'écosystèmes marins comme c'est le cas de *P.marincola* (Romanenko *et al.*, 2008), ou encore d'écosystème désertiques *P.duriflava* (Lui *et al.*, 2008). Cette distribution semble être due à une adaptabilité physiologique et génétique élevée (Spires *et al.*, 2000).

1.3.2.5. Importance des *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* occupent la plupart des environnements naturels. Elles sont isolées de l'eau, sol, des poussières en suspension dans l'air et des végétaux. Elles présentent un fort potentiel d'adaptation physiologique et génétique et sont capable d'utiliser une grande variété de nutriments. D'un point de vue écologique, les *Pseudomonas* regroupent des espèces bénéfiques pour l'environnement et des espèces pathogènes.

Dans le milieu extérieur, les *Pseudomonas spp* sont capables de dégrader de nombreux composés organiques, parmi lesquels des composés halogènes, des hydrocarbures aromatiques et des herbicides (Ramos, 2004). Ces bactéries peuvent aussi être utilisées dans les processus de décontamination des sols (bioremediation, Stallwood *et al.*, 2005).

Le genre *Pseudomonas* a un intérêt industriel important, par ex : les membres psychrotrophiques des *Pseudomonas* sont en mesure à produire thermiquement les protéases résistantes et /ou lipases (Gounot, 1991). Qui peuvent résister à la pasteurisation et même le traitement à température ultra haute. *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, et *P. pagi* sont utilisés pour la production des lipases extracellulaire (acylhydrolase de triacylglycérol) qui catalysent l'hydrolyse des triglycérides à longue chaîne (Harwood, 1989). La lipase est employée pour l'hydrolyse des grosses tâches qui tendre à rester sur le tissu pendant le lavage. Une autre

enzyme industriellement important de *Pseudomonas* est l'amylase qui a été utilisé pour la production des malto_oligosaccharides par la digestion enzymatique de l'amidon (Shida *et al.*, 1992). Les α -galactosidase sont un autre groupe d'intérêt elles catalysent également la réaction de transgalactosylation (Hashimoto *et al.*, 1991).

L'activité métabolique bien connue des *Pseudomonas* des hydrocarbures aromatiques suggère leur emploi dans l'hydroxylation, réaction impliquant les composés aromatiques ou le Trifluorométhylbenzène est hydroxylé en diolé par *P. putida*. Le diolé, un produit du toluène est employé pour la production de la prostaglandine chirale déshydrogénase de cis_glycol (Davies *et al.*, 1990). *P. chlororaphis* est employée dans la production industrielle de l'acrylamide et l'hydratase de nitrile (Nishiyama *et al.*, 1992).

L'application potentielle des *Pseudomonas* dans la bioremediation en raison de leurs possibilités bien connues pour dégrader les composés xénobiotiques, particulièrement les produits organiques halogènes, utilisés comme herbicides, dissolvants et des décapants (biotechnologie, 1993). Les *Pseudomonas* décrits comme des bactéries phytoprotectrices jouant un rôle prépondérant dans le biocontrôle de la rhizosphère (Walsh, 2001).

D'autres espèces sont pathogènes pour les plantes, comme *P. syringae* qui compte au moins 37 pathovars capables d'infecter de nombreuses espèces végétales (Sawada *et al.*, 2002). Chez l'homme, les *Pseudomonas spp.* peuvent également se comporter comme des agents opportunistes et être à l'origine d'infections iatrogènes et/ou nosocomiales. En raison de la richesse de leurs voies métaboliques, elles sont souvent capables de résister à de nombreux antiseptiques ou antibiotiques. Ceci explique leur présence, de plus en plus fréquente en milieu hospitalier, ou elles peuvent être isolées de l'environnement humide, des denrées alimentaires, des réactifs biologiques, des solutés injectables, du sang ou des dérivés sanguins conservés au froid (Feuilloley, 2007).

Au niveau de la rhizosphère (surface des racines et sol environnant), les *Pseudomonas spp.* ont un effet bénéfique en mobilisant certains nutriments nécessaires à la croissance de la plante. Elles peuvent aussi la protéger contre les microorganismes pathogènes en stimulant les mécanismes de résistance intrinsèques de la plante, en sécrétant des composés antibactériens et antifongiques et/ou par la compétition vis-à-vis de certains nutriments (Mezaache, 2010).

I.3.2.6. *Pseudomonas* comme agent de biocontrôle

Les *Pseudomonas* fluorescentes constituent le groupe le plus important des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et impliqués dans le biocontrôle des maladies des plantes. Grâce à différentes propriétés, incluant, la colonisation efficace des racines, des tubercules,

etc. et à la capacité d'utiliser un grand nombre de substrats organiques. Les *Pseudomonas* sont généralement rencontrés au niveau des racines et sèment des exsudats ; relativement faciles à cultiver dans les conditions de laboratoire, la production de variété de métabolites secondaires qui empoisonnent les bactéries et les champignons pathogènes et la compatibilité des plantes avec les pesticides généralement utilisés comme agents de biocontrôle.

Suryakala *et al.* (2004) ont rapporté que *Pseudomonas fluorescens* isolé de la rhizosphère été antagonique à *Fusarium oxysporum*, *Alternaria. sp* et *Colletotrichum capsicii*. Dans une étude sur la suppression de flétrissement du à *Verticillium* huit isolats de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* obtenu à partir des racines d'oliviers, Mercado-Blanco *et al.* (2004) ont observés une réduction de la maladie par tous les isolats dans des conditions contrôlées.

L'HCN produit dans des analyses *in vitro*, Mishra *et al.* (2005) ont rapporté que deux souches de *Pseudomonas* fluorescentes à savoir, RRLJ134 et RRLJ04 isolées de la rhizosphère de thé et la rhizoplane du riz respectivement, ont donné un antibiosis *in vitro* significatif contre *Fomes lamoensis* et *Ustilina zonata* agents causaux de la putréfaction brune du riz et le charbon du bois des racines de thé respectivement. L'application de ces dernières souches a permis la suppression significative des maladies au niveau des pépinières.

La production d'antibiotiques est identifiée comme un facteur important dans la suppression des maladies par les *Pseudomonas* fluorescentes, en produisant différents composés tel, la Phenazine, Pyocyanin, 2-Phloroglucinol, 4-diacetyl, Pyoleuteonine, Nitrine de pyrrol et Tropolone (O'Sullivan et O'Gara, 1992). Certaines de ces derniers composés comme le tropolone ont un large spectre d'activité contre beaucoup de microbes pathogènes bactériens et fongiques qui peuvent ne pas être souhaitables toujours parce qu'ils peuvent éliminer beaucoup de microorganismes bénéfiques (Lindberg, 1981).

Le rôle des métabolites antimicrobiens dans la suppression du flétrissement de la lentille du à *Fusarium oxysporum* a été rapporté dans des conditions *in vitro* par (Rao *et al.*, 1999). Pal *et al.*(2000) ont rapporté que les pigments fluorescents et les antibiotiques antifongiques ont été produits par *Pseudomonas glumae* responsable du biocontrôle de *R. solani*. Ahmadzadeh *et al.* (2004) en étudiant la production de métabolites antimicrobiens par les *Pseudomonas* ont observé que 15 sur 19 isolats ont pu produire le phloroglucinol -du diacétyle 2-4. La Production du 2-4 phloroglucinol diacétylique par des *Pseudomonas* isolés de la rhizosphère du tabac était également enregistrée par Ramette *et al.* (2006).

L'HCN empêche le fonctionnement approprié des enzymes et les récepteurs naturels par le mécanisme réversible de l'inhibition (Corbett, 1974). On le connaît également pour

empêcher l'action du cytochrome oxydase (Gebring *et al.*, 1993). L'HCN est produit par beaucoup de rhizobactéries et il est soupçonné de jouer un rôle dans la lutte biologique contre les pathogènes (Defago *et al.*, 1990). Dix *Pseudomonas* fluorescentes isolées à partir de la rhizosphère du tournesol, pomme de terre et du maïs ont été capables d'augmenter la croissance des plantes et de supprimer la nécrose du collet du tournesol à travers un mécanisme de suppression de la maladie par la production d'HCN (Shivani *et al.*, 2005).

Chapitre II

*Etude du pouvoir antagoniste
antifongique des rhizobactéries in Vitro*

Chapitre II : étude du pouvoir antagoniste antifongique des rhizobactéries *In Vitro*

II.1. Introduction

La lutte biologique, par l'utilisation de microorganismes, est une alternative très prometteuse par rapport aux fongicides par leurs spécificité et l'efficacité d'action, l'ubiquité naturelle de ces agents dans les écosystèmes, leur dissémination facile et leur persistance dans l'environnement. Des travaux ont rapporté que ces microorganismes appartiennent surtout aux genres, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Trichoderma* (Agrios, 2005). La majorité des études montrent que de 1 à 10% des isolats du sol peuvent avoir un certain pouvoir antagoniste *in vitro*, mais très peu ont la capacité de supprimer les agents phytopathogènes dans divers sols et conditions de croissance et encore moins qui sont capables d'inhiber la croissance d'un large spectre d'espèces pathogènes (Fravel, 2005).

L'antagoniste doit posséder les enzymes nécessaires, soient des chitinases pour briser la paroi cellulaire de la majorité des champignons ou des cellulases pour briser celle des oomycètes (El-Hamshary et Khattab, 2008). Le plus connu de tous les hyperparasites est sûrement le genre *Trichoderma* spp. En effet, les hyphes de *Trichoderma* s'enroulent et pénètrent les hyphes d'un microorganisme causant ainsi la lyse. Les genres *Pseudomonas* et *Bacillus* sont aussi impliquée dans le contrôle d'un certain nombre d'agents pathogènes des plantes cultivées.

Le chapitre suivant va traiter de l'antagonisme de plusieurs souches bactériennes des genres *Bacillus* et *Pseudomonas* et espèces apparentées envers plusieurs isolats de *Fusarium oxysporum* *fs. ciceris*.

II.2. Matériels et méthodes

II.2.1. Echantillonnage et aires de culture

Les échantillons ont été prélevés à partir de différentes parcelles de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) cultivées des wilayas de Sidi Belabbas, Rélizane, Ain Témouchent, Mascara, Blida, Constantine, Skikda et Sétif. La collection d'échantillon effectuée entre 2013 et 2015, consistait à des prélèvements de sol à une profondeur de 10 à 15cm englobant la rhizosphère de la culture de pois chiche. Les échantillons sont ensachés, numérotés et conservés à 4°C au niveau du laboratoire en vue d'être analysés ultérieurement.

II.2.2. Isolement et purification de l'agent pathogène (FOC)

La technique d'isolement utilisée est celle décrite par Rapilly, (1968). Elle consiste à préparer des petits fragments de tiges et de racines d'environ 0.6 cm à partir des plantes infectées. Les fragments sont ensuite désinfectés soit à l'aide d'hypochlorite de sodium 80%, soit à l'aide d'alcool à 95% pendant 3minutes, puis rincés trois fois avec de l'eau distillée stérile. Après un séchage entre deux papiers filtres stériles, les fragments de tiges, de racines et de collets sont déposés dans des boîtes de pétri contenant du milieu PDA gélosé à raison de six fragments par boîte. Les boîtes sont ensuite incubées à l'obscurité et à 25°C pendant cinq à six jours jusqu'au développement de colonies fongiques (Leslie, Summerell, 2006).

Les colonies fongiques obtenues et identifiées selon leur aspect macroscopique sont conservées à 4°C dans des tubes à essai contenant du milieu PDA incliné, afin de constituer une collection d'isolats qui devrait servir aux études ultérieures.

II.2.3. Identification des isolats de *Fusarium oxysporum* fs. *ciceris*

II.2.3.1 Caractérisation macroscopique

Les caractéristiques macroscopiques sont relevées visuellement à l'œil nu. Elles concernent surtout, la vitesse de croissance, l'aspect du mycélium, la couleur du mycélium du deux cotés de la boîte de Pétri (recto et verso) et la diffusion ou non des pigments dans le milieu. Le milieu PDA a été utilisé pour la recherche des caractères morphologiques des isolats. C'est un milieu qui est communément utilisé pour caractériser les espèces du genre *Fusarium* (Ioos, 2001, Toussons et Nelson, 1976, Liddell et Barrages, 1983).

II.2.3.2 Caractérisation microscopique

L'observation du pathogène au microscope permet l'identification des champignons en se basant sur les caractères morphologiques des spores. Cet examen est réalisé en déposant un fragment d'une colonie entre une lame et une lamelle, dans une goutte de bleu coton ou dans du lactophénol (colorant spécifique des champignons) (Anonyme, 2008).

II.2.4. Effets des facteurs physicochimiques sur la croissance des isolats du FOC

Il s'agit d'une série de tests, permettant de mettre en évidence l'influence des facteurs physicochimiques tels que les milieux de culture, le pH du milieu, la température et la lumière sur la croissance et la sporulation des souches fongiques.

II.2.4.1. Effet du milieu de culture sur la croissance mycélienne et la sporulation

Les deux milieux les plus utilisés dans la croissance mycélienne des *Fusarium* ont été testés à savoir le PDA et le SNA. L'objectif est de déterminer le milieu de culture le plus approprié à la croissance mycélienne et la production des spores pour nos isolats fongiques.

La mise en culture s'est effectuée par dépôt au centre de la boîte de Pétri d'une bouture mycélienne de 5mm de diamètre, prélevée de l'extrémité marginale d'une culture âgée de 7 jours. La croissance mycélienne est mesurée aux troisième et septième jours d'incubation par la mesure des deux diamètres perpendiculaires (Blaise *et al.*, 2001). En plus, la sporulation a été déterminée par comptage à la cellule de Malassez après les mêmes périodes d'incubation que précédemment. On note que pour chaque test deux boîtes de Pétri ont été utilisées en guise de répétitions et la moyenne a été calculée à chaque fois pour les quatre isolats étudiés.

II.2.4.2. Effet de la température sur la croissance mycélienne

La température influence la croissance mycélienne des champignons ainsi que leur métabolisme. En plus, elle a une action sur la vitesse des réactions chimiques et biochimiques (Castellanos *et al.* (2000). Pour étudier ce paramètre chez les quatre isolats du FOC, les cultures mycéliennes ont été incubées à différentes températures allant de 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C jusqu'à 35° pour une durée d'une semaine de culture. Comme précédemment, deux boîtes de Pétri ont été utilisées en guise de répétitions et la moyenne a été calculée à chaque fois pour les quatre isolats étudiés.

II.2.4.3. Effet du pH du milieu sur la croissance mycélienne

Dans le but d'apprécier l'action du pH sur la croissance de quatre isolats du FOC, nous avons ajusté le pH du PDA à différents degrés allant de 5 à 8. Cette gamme tamponnée permet d'éviter toute variation lors de la dégradation des éléments nutritifs par le champignon. Le pH est contrôlé à l'aide d'un pH-mètre pour une éventuelle correction. En effet, des disques de 5mm ont été déposés au centre des boîtes de Pétri et incubées à la température de 25°C et à l'obscurité. L'action de pH est évaluée par la mesure des deux diamètres perpendiculaires (Castellanos *et al.* (2000)).

II.2.4.4. Effet de la lumière sur la croissance mycélienne et la sporulation

La durée d'éclairage joue un rôle important dans le développement des champignons. L'étude de l'impact de ce paramètre sur la croissance de nos isolats a été réalisée en deux conditions de lumière. La première consiste à incuber les boîtes de Pétri contenant des cultures mycéliennes à l'obscurité totale (24h/24h) alors que la deuxième consiste à alterner une photopériode de 12h avec une durée de 12 à l'obscurité (Waite et Stover 1960 ; El Aoufir, 2001). Après une durée d'une semaine d'incubation les dimensions des colonies et le nombre de spore ont été déterminés.

II.2.5. Etude de l'activité antagoniste *in vitro*

II.2.5.1. Inhibition de la croissance mycélienne *in vitro*

L'inhibition de la croissance mycélienne du FOC a été estimée en suivant la méthode de Vincent *et al.* (1991). Cette dernière consiste à inoculer en stries la moitié de la boîte de Pétri avec 20µl de la suspension bactérienne, puis incubée à 28°C pendant 48 heures. Par la suite, un disque de 5mm de diamètre d'une colonie fongique du FOC est prélevé à partir d'une culture fraîche de 7 jours à l'aide de l'emporte-pièce puis placée dans l'autre moitié de la boîte contenant le milieu PDA avec une distance éloignée de 3cm des stries bactériennes (figure 5). Les boîtes sont incubées pendant 7 jours à 28°C, l'expérience a été répétée 3 fois.

Le diamètre de la croissance mycélienne du champignon a été mesuré après le 4^{ème} et 7^{ème} jours et comparé à la croissance du témoin où la suspension bactérienne a été remplacée par le bouillon nutritif stérile. Le taux d'inhibition a été calculé en selon la formule suivante :

% inhibition de croissance	=	$\frac{\text{Croissance fongique}}{\text{Croissance du témoin}} \times 100$
-----------------------------------	---	---

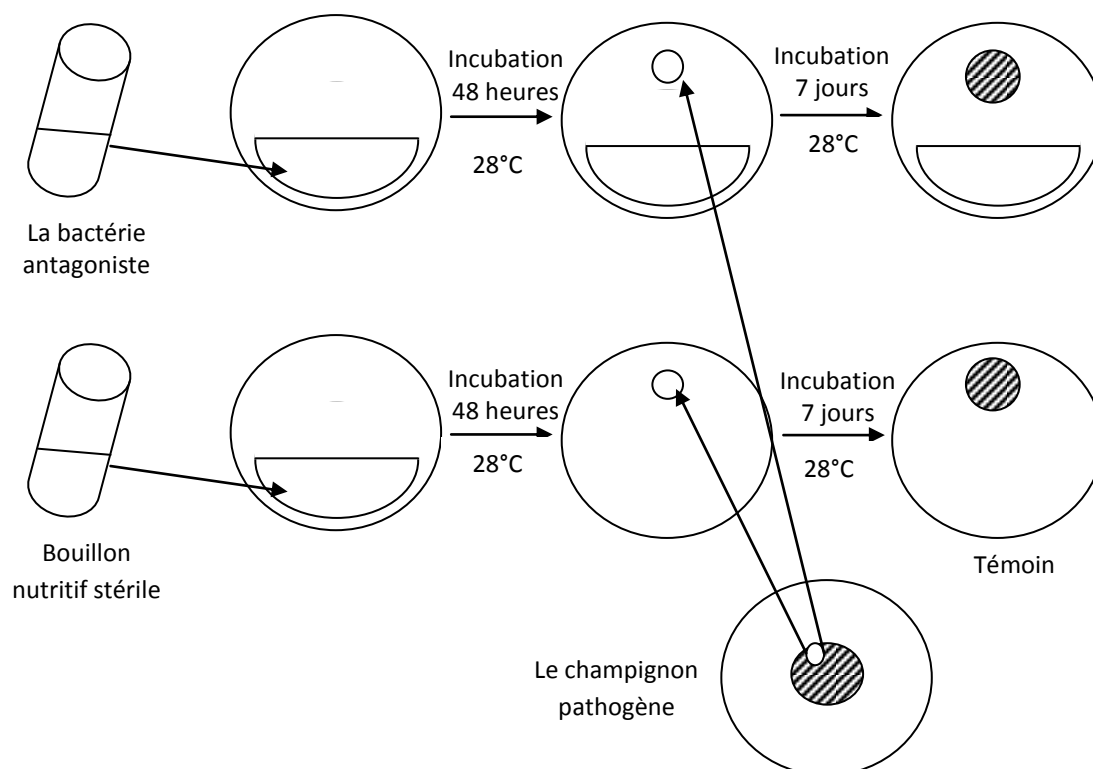


Figure 5: Inhibition du champignon par les produits diffusibles selon Vincent et *al.* (1991).

II.2.5.2. Etude de l'antagonisme par les composés volatiles

Une quantité de 100ml de la suspension bactérienne 5×10^9 CFU/ml était placée au centre de boîte de pétri contenant le milieu GN et un disque de 10mm d'une culture pure de 4jours du FOC a été placée au centre d'une boîte de pétri contenant le PDA. Les deux boîtes ont été placés face à face empêchant tout contact physique entre le FOC et la bactérie antagoniste et elles ont été scellées pour isoler l'atmosphère intérieure afin d'empêcher la perte des composés volatiles produits. Les boîtes ont été incubés à 28°C pour cinq jours et la croissance mycélienne du FOC a été mesurée et à la croissance mycélienne du même champignon en absence de la bactérie antagoniste. Le test a été répété Chaque isolat bactérien a été testé trois fois et à chaque fois trois boîtes de pétri ont été utilisées. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes des pourcentages d'inhibition +S.D. de la croissance de FOC en présence et absence de tout isolat bactérien (Fiddaman and Rossall, 1993).

II.2.6. analyse statistique des résultats

Les résultats obtenus ont été traités statistiquement à travers l'analyse de la variance (ANOVA) au seuil de 5% en se basant sur le SPSS.20. Aussi, les moyennes des différents paramètres mesurés ont été comparées et des histogrammes ont été développés (Excel, 2010).

II.3. Résultats et discussion

II.3.1. Isolement de l'agent pathogène

Le matériel fongique utilisé provient des échantillons de plantes infectées présentant des symptômes caractéristiques de la maladie du flétrissement due au champignon *Fusarium oxysporum* f.s. *ciceris*. Les échantillons ont été prélevés à partir de plusieurs aires de culture de pois chiche de l'Algérie. Les isolats du pathogène ont été codés FOC1 pour celui récolté de la région d'Ain Témouchent, FOC2 prélevé à partir de Sidi Bel Abbas, FOC3 récolté de la Station expérimentale de l'ITGC de Sétif et le FOC4 rencontré dans une parcelle de pois chiche infectée à Mascara. Ces régions ont été choisies en raison de l'importance des superficies cultivées en pois chiche.

La mise en culture sur milieu de PDA de fragments de tissus symptomatiques de pois chiche, a révélé la présence de colonies typiques de *Fusarium oxysporum*. C'est un champignon pathogène faisant partie de la famille des Moliniacées. Sur la base de plusieurs caractéristiques liées aux symptômes observés sur la plante hôte, nous poussons à soupçonner que cette espèce correspond à la forme spéciale *ciceri* du *F.oxysporum*. Néanmoins, il reste à confirmer cette hypothèse par la vérification du postulat de Koch. D'autres tests de caractérisation biologique s'imposent pour déterminer le degré d'agressivité des isolats rencontrés sur différentes variétés de pois chiche, afin de pouvoir déclarer que cette espèce est bien pathogène et responsable des symptômes observés sur les cultures de pois chiche au niveau des parcelles échantillonnées.

II.3.1. Caractérisation morphologique des souches rencontrées

II.3.1.1 Caractérisation macroscopique

L'ensemencement de fragments de pois chiche symptomatiques sur milieu PDA, a donné des colonies plus ou moins différentes, mais répondant d'une manière générale aux morphotypes mycéliens connus de *Fusarium oxysporum* (figure 6).

En effet, le FOC1 a donné un morphotype ras muqueux avec une rareté assez prononcée du mycélium aérien. Alors que le FOC2 se présente sous forme de mycélium aérien cotonneux très abondant, épais et dense de couleur rosâtre. En revanche, les isolats codés FOC3 et FOC4 ont donné un mycélium très abondant épais et dense de couleur blanc-crème.

Concernant la production de pigments, après 5 à 7 jours de culture, le thalle des quatre souches vire de la couleur blanchâtre au rose voir rouge carmin observé sur le dessous des boîtes, en raison de la production des pigments. La croissance mycélienne est excellente sur le

milieu PDA, nous avons enregistré des diamètres supérieurs à 80mm pour les isolats fongique FOC1, FOC2, et FOC4, alors que le FOC3, il se distingue par un diamètre de la colonie inférieur, il est égale à 59mm (Tableau 4).

L'ensemencement des isolats fongiques sur le milieu SNA a donné une grande variabilité en matière de morphotype et de pigmentation produite comparativement au milieu PDA. En effet, le FOC1 a produit des hyphes mycéliens très fins de couleur blanchâtre, le FOC 2 a donné un mycélium granulé de couleur rose claire et le FOC3 et le FOC4 ont produit des mycéliums blanc cotonneux non condensé.

En regard à la croissance mycélienne, si pour les FOC1, FOC2 et FOC4 on n'observe pas de différence entre les deux milieux. En revanche, le FOC3 se développe mieux sur le Milieu Spezieller Nährstoffärmer Agar (SNA), avec un diamètre de croissance de 78,50mm

Concernant la sporulation, on relève que le milieu SNA a amélioré la sporulation des quatre isolats, la preuve le nombre des spores de FOC3 sur le milieu de PDA est de $2,2 \times 10^5$ alors que sur SNA, le nombre augmente à $7,9 \times 10^5$ (Tableau 5).

Tableau 4 : Caractéristiques macroscopiques des colonies des isolats de FOC sur les milieux de cultures.

Isolats	Milieu PDA		Milieu SNA	
	Morphotype	Pigmentation	Morphotype	Pigmentation
FOC1	Ras muqueux	Violette	Mycélium fin	Blanche
FOC2	Cotonneux	Rose	Duveteux	Rose claire
FOC3	Cotonneux	Blanche	Cotonneux non condensé	Blanche
FOC4	Cotonneux	Beige	Cotonneux non condensé	Blanche

Tableau 5: Effet des milieux culture sur la croissance et la sporulation des isolats de FOC.

Isolats	Sur le milieu PDA			Sur le milieu SNA		
	Croissance à 3 ^{ème} jours	Croissance à 7 ^{ème} jours	Sporulation à 7 ^{ème} jours	Croissance à 3 ^{ème} jours	Croissance à 7 ^{ème} jours	Sporulation à 7 ^{ème} jours
FOC1	47mm	83mm	$5,9 \times 10^5$	28,50mm	83mm	$3,4 \times 10^5$
FOC2	37mm	83mm	6×10^5	22mm	73,50mm	$8,3 \times 10^5$
FOC3	25mm	59mm	$2,2 \times 10^5$	30mm	78,50mm	$7,9 \times 10^5$
FOC4	23,50mm	81,50mm	$1,1 \times 10^5$	28,50mm	74mm	$7,2 \times 10^5$

Statistiquement, l'analyse de la variance au seuil 5% a montré un effet significatif du milieu sur la croissance et la sporulation des isolats du FOC. Aussi, nous avons obtenu un

effet significatif de l'interaction milieu-isolats du FOC. Cela, signifie que les milieux de cultures influencent la croissance et la sporulation des isolats du FOC (Tableau 6).

Tableau 6 : Analyse de la variance de l'effet de milieu sur la sporulation des isolats de FOC.

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Sporulation	5,154	1	5,154	11,203	0,012
Milieux	2,761	1	2,761	6,002	0,044
Isolats_FOC	453,174	3	151,058	328,318	0,000
Milieux * Isolats_FOC	505,754	3	168,585	366,411	0,000
Erreur	3,221	7	0,460		
Total	94114,250	16			
Total corrigé	1012,984	15			

II.3.1.2 Caractérisation microscopique des isolats de FOC

La détermination microbiologique de l'espèce d'un isolat de *Fusarium* sp. Repose sur l'observation de nombreuses caractéristiques morphologiques microscopiques.

L'observation microscopique effectuée à l'aide d'un microscope optique au grossissement x100, révèle la présence d'un mycélium cloisonné et ramifié, des conidiophores très courts, ainsi que des macroconidies et des microconidies caractéristiques du genre *Fusarium* (Figure 6). Nous avons remarqué que les 4 isolats étudiés donnent naissance après une semaine de culture de microconidies en abondance, largement supérieures en nombre par rapport aux macroconidies qui sont épaisses et dispersées. De même, après trois semaines environ culture, l'observation microscopique révèle la présence de chlamydospores suite à l'appauvrissement du milieu de culture en nutriments (figure 7).

L'étude de la morphologie du thalle et sa pigmentation, d'après les résultats obtenus montrent qu'une variabilité importante de la morphologie existe entre les isolats du FOC étudiés. L'observation des caractères morphologiques de quatre isolats de FOC, révèlent une hétérogénéité au sein de la forme spéciale ciceris, nos résultats coïncident avec ceux obtenus par Trujillo et al (2005) qui ont également détecté un degré élevé de variabilité phénotypique et génétique dans les souches de *Fusarium spp*, responsable du flétrissement dans les œillets.

Il a été signalé que le *Fusarium oxysporum* change de couleur sur le milieu de croissance PDA (Groenewald *et al.*, 2006). Le mycélium aérien est blanc et peut être varié du violet au violet foncé selon les souches et les conditions de l'environnement tel que le milieu

de croissance, la lumière et la température qui peuvent provoquer la production de pigment (Rodrigues et Menezes., 2005 ; Rosa Marina Arvayo-Ortiz *et al*, 2011). D'après Messien et Cassini (1968, 1981) ; la pigmentation est un critère clé dans la détermination des espèces de *Fusarium*. Cependant si elle constitue un critère d'identification au niveau de certaines espèces, elle ne permet pas de distinguer les formes spéciales de *F.oxysporum*, plusieurs d'entre elles pouvant manifester une même coloration comme c'est le cas des formes *lycopersici*, *pisi* (Cherrab 1989). C'est pour cela que le milieu SNA est utilisé, il permet une étude spécifique et une détermination claire de l'espèce (anonyme, 2008).

Les caractéristiques microscopiques et macroscopiques des isolats du FOC montrent une variation phénotypique ce qui corrobore avec celles observées dans d'autres études qui identifient le FOC comme une des espèces les plus variables dans son genre (Domsch *et al.*, 1993 ; Duenas *et al.*, 2003 ; Groenewald *et al.*,2006). Les formes des microconidies et macroconidies sont similaires à celles de Haware et al (1986), la forme sexuée n'est pas encore rapporté dans la nature, la variation morphologique et parasitaire de *Fusarium oxysporum* doivent donc s'expliquer sans faire appel à des phénomènes sexuels (Messien et Cassini, 1968). Cette variabilité morphologique au sein d'une même forme spéciale a été également signalée par Cherrab (1989).

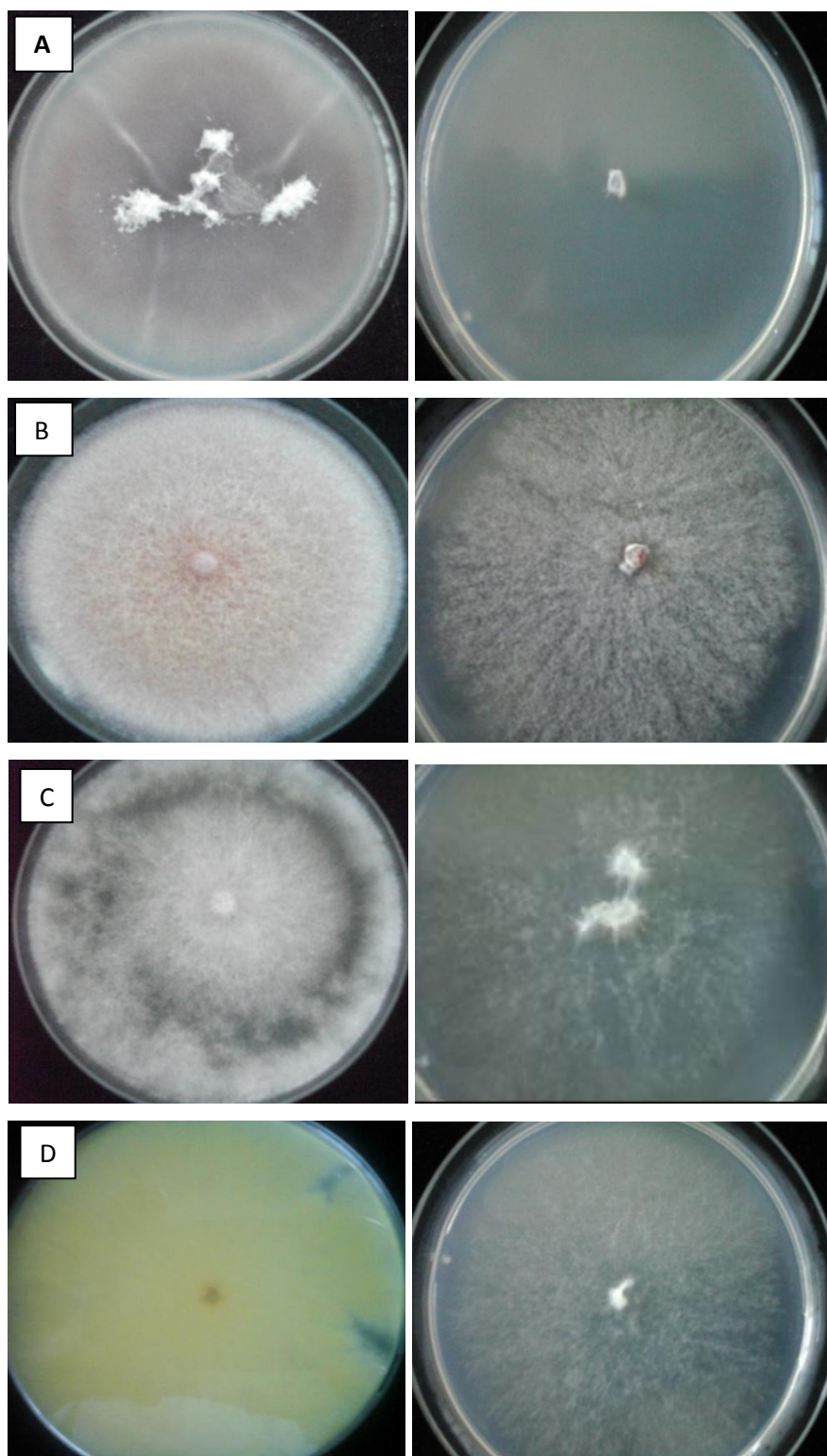


Figure 6 : Aspects des colonies fongiques des différents isolats de *Fusarium oxysporum* sur PDA (à gauche) et sur milieu SNA (à droite). A) FOC1, B) FOC2, C) FOC3 et D) FOC4.

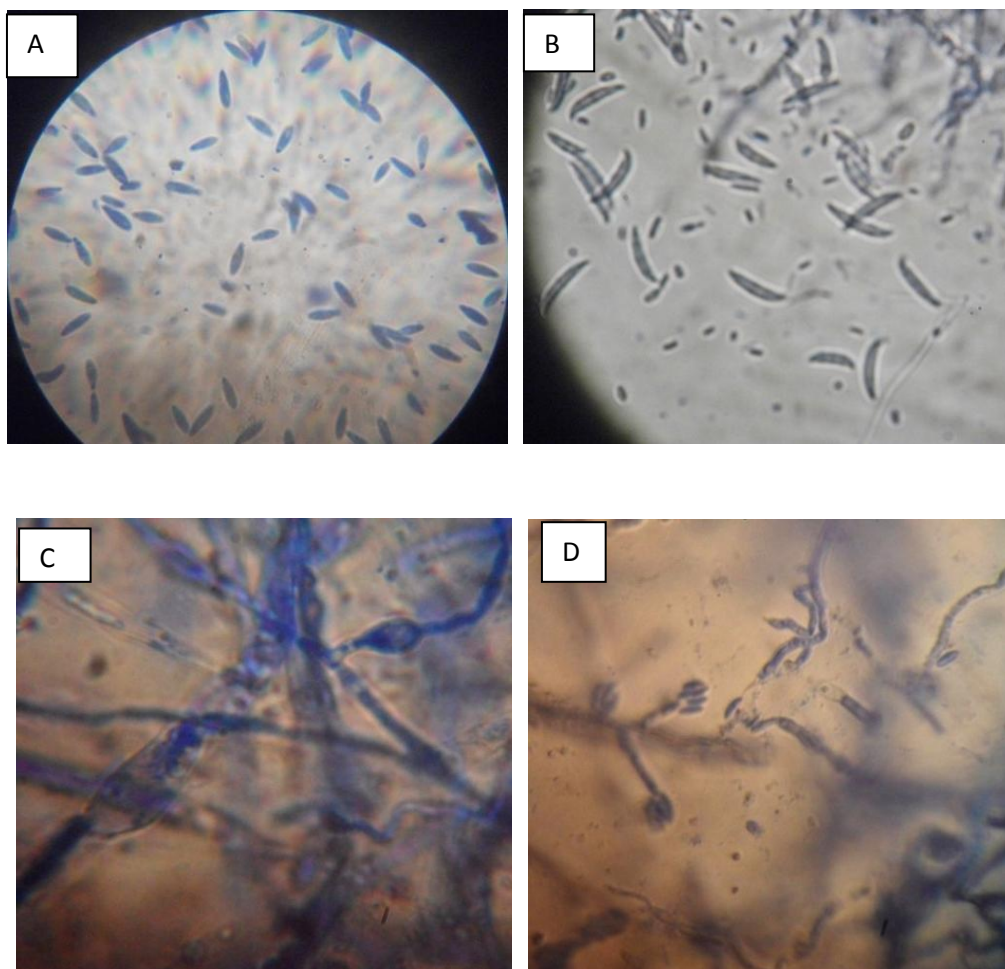


Figure 7 : Aspects microscopiques du FOC : A) Microconidies (100X) ; B) Macroconidies, C) Chlamydospores (100X) et D) Conidiophores (40X).

II.3.2. Effets des facteurs physicochimiques sur la croissance des isolats du FOC

II.3.2.1- Effets de la température sur la croissance mycélienne

Les quatre isolats du *Fusarium* se sont bien développés aux températures comprises entre le 10 °C et 35°C. Quoique, l'intervalle de température comprise entre 20°C et 30°C, a permis une bonne croissance mycélienne. En effet, le diamètre des colonies fongiques varie de 40mm pour le FOC1 à la température de 20°C à 62.5mm de diamètre pour les FOC1, FOC2 et FOC4 à la température de 30°C. le FOC1 semble exiger une température légèrement supérieure à 20°C, en revanche le FOC3 semble exiger une température légèrement inférieure à 30°C (Tableau A, annexe1).

D'après les résultats obtenus, il en ressort que la température de 25°C est la plus optimale pour la croissance des quatre FOC, où les diamètres des colonies fongiques variaient entre 62.5 mm et 68.5mm pour les FOC2 et FOC4, et FOC1 respectivement. En plus, les températures 10°C et 35°C semble ralentir drastiquement la croissance mycélienne, et la température de 5°C semble être létale pour le développement du *Fusarium oxysporum f.s. ciceri* ; ce qui est important pour la conservation du champignon pour de longues périodes. Pour le FOC1 et le FOC3 (Figure 8).

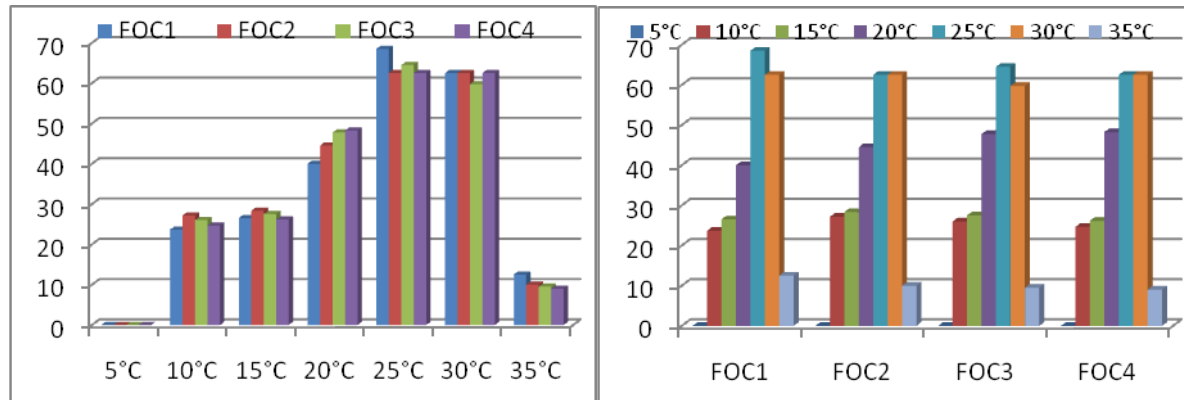


Figure 8: Histogrammes de la croissance mycélienne en fonction des isolats du FOC (à gauche) et des températures (à droite).

Sur le plan statistique, l'analyse de variance au seuil 5% a montré un effet significatif de la température sur la croissance mycélienne des isolats du FOC et aussi de l'interaction température – isolats de FOC alors qu'elle est non significative entre les isolats du FOC. Cela signifie que les isolats du FOC se comportent de manière très proche à la variation de température (Tableau 8).

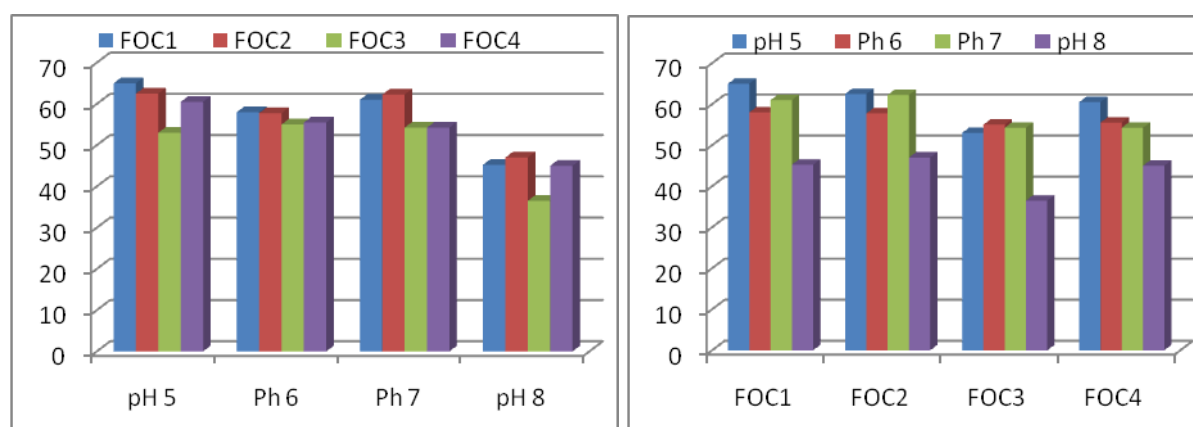
Tableau 8 : Analyse de la variance de l'effet de la température sur la croissance mycélienne des quatre isolats de FOC.

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Température	18710,81	5	3742,16	1142,67	0,000
Isolats_FOC	0,87	3	,29	0,09	0,965
Température * Isolats_FOC	189,50	15	12,63	3,86	0,002
Erreur	78,59	24	3,27		
Total	87902,46	48			
Total corrigé	18979,79	47			

II.3.2.2- Effet du pH du milieu sur la croissance mycélienne

Globalement, les quatre isolats étudiés se comportent d'une manière plus ou moins différente à la variation du pH du milieu de culture. Ainsi, le pH de 8 qui donne une légère alcalinité au milieu de culture, semble ralentir la croissance mycélienne des quatre isolats. En revanche, le pH acide égal à 5 semble plus favorable au développement des FOC1, FOC2 et FOC4 alors qu'il ralentie légèrement la croissance du FOC3, ou le diamètre de la colonie fongique n'était égale qu'à 53mm alors qu'il est supérieur à 60mm pour les reste des isolats (Tableau B, annexe1).

D'une manière générale, les résultats nous donnent que le pH 5 est le plus favorable pour la croissance des isolats FOC1, FOC2, et FOC4. Cependant le pH 6 est optimal pour le développement de l'isolat 3 (Figure 9).

**Figure 9 :** Croissance mycélienne en fonction des isolats du FOC et de la variation du pH.

L'analyse de variance au seuil de 5%, nous a donné un effet pH significatif de la croissance mycélienne en fonction du pH et des isolats du FOC. Aussi, l'interaction variation du pH – isolats de FOC est significative au seuil 5% (Tableau 9).

Tableau 9 : Analyse de variance de l'effet de pH sur la croissance mycélienne de FOC.

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Isolat_FOC	336,193	3	112,064	34,461	0,000
Degrés_pH	1544,631	3	514,877	158,329	0,000
Isolat_FOC * Degrés_pH	106,721	9	11,858	3,646	0,012
Erreur	52,031	16	3,252		
Total	93337,563	32			
Total corrigé	2039,576	31			

II.3.2.3. Effet de la lumière et l'obscurité sur la croissance mycélienne et la sporulation

Les résultats notés dans les tableaux, montrent que les conditions de culture en matière de la lumière et d'obscurité la croissance mycélienne n'est pas assez prononcée à l'exception du FOC1 où nous avons enregistré un diamètre de 42,50mm avec l'obscurité totale et seulement 25,75mm avec une alternance de la lumière et l'obscurité (Tableau 10).

En ce qui concerne la sporulation, l'alternance de la lumière et l'obscurité a améliorée d'une manière générale la production des spores pour les quatre isolats étudiés. Ceci est assez notable pour le FOC4, passant de $1,1 \times 10^5$ spores avec une obscurité totale à 7×10^5 spores avec une alternance de lumière.

Tableau 10 : Effet de la lumière et l'obscurité sur la croissance mycélienne et la sporulation

Isolats fongiques	Obscurité totale (24h/24h)		Alternance lumière – Obscurité (12h/12h)	
	Croissance mycélienne	Sporulation	Croissance mycélienne	Sporulation
FOC1	42,50mm	$2,2 \times 10^5$	25,75mm	$5,9 \times 10^5$
FOC2	45,50mm	6×10^5	43,50mm	$7,1 \times 10^5$
FOC3	34,75mm	$2,2 \times 10^5$	27,25mm	$6,7 \times 10^5$
FOC4	36,75mm	$1,1 \times 10^5$	34,75mm	7×10^5

Sur le plan statistique, l'analyse de variance au seuil de 5% montre un effet non significatif de la lumière sur la croissance et la sporulation des isolats du FOC. Alors que leur interaction (lumière – isolats de FOC) est significative (Tableau 11). Nous déduisons de cette

analyse que ni la lumière ni la diversité des isolats du FOC n'ont un effet sur la croissance mycélienne et la sporulation.

Tableau 11 : Analyse de variance de l'effet de la lumière sur la sporulation des isolats de FOC.

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Sporulation	4,324	1	4,324	1,028	0,344
Effet_Lumière	10,740	1	10,740	2,552	0,154
Isolats_FOC	30,179	3	10,060	2,391	0,154
Effet_Lumière * Isolats_FOC	233,284	3	77,761	18,479	0,001
Erreur	29,457	7	4,208		
Total	21867,313	16			
Total corrigé	642,465	15			

De nombreuses espèces fongiques montrent des exigences généralement identiques ou proche, mais chaque espèce a des conditions particulières pour sa croissance et sa sporulation (Moreau, 1983). Les résultats obtenus, indiquent que la température optimale de quatre isolats de FOC est située entre 25 et 30°C, ce résultat se rapproche des résultats des travaux de plusieurs auteurs (Walker, 1965 ; Molot et Mas., 1975 ; Molot *et al.*, 1990 ; Bekkar 2007 ; Farooq *et al.*, 2005). Ces mêmes auteurs ont montré que le *Fusarium* ne se développe pas aux températures voisines de 4°C et de 36°C (Grupta *et al.*, 1986). Plusieurs auteurs ont signalé que la croissance du FOC est influencée par la température (Navas-cortés *et al.*, 2000 ; Landa *et al.*, 2001 ; Sharma et Muehlbauer, 2007). Une température autour de 25°C est optimale pour le développement de ce champignon. De même, Molot et Mas (1975), ont rapporté que le pouvoir pathogène était stimulé par des températures moyennes de 22°C. Vujanovic *et al* (2006) ont enregistré que le FOC au Canada peut se développer même à des températures extrêmes comprises entre -15°C et -5°C, en revanche dans le Nord-Ouest du Mexique dans des conditions d'extrême aridité, le FOC est largement distribué (Arvayo- Ortiz *et al.*, 2011).

L'effet de pH s'est révélé comme un facteur de grande importance pour le développement du champignon. Nos résultats montrent que les isolats de FOC peuvent croître aussi bien dans des pH acide (5-6) que dans des pH légèrement alcalin. Ces résultats concordent avec ceux de (Rosa Marina Arvayo- Ortiz *et al.*, 2011). Bien que le pois chiche se développe bien en pH 6, et il peut se développer lorsque le pH est de 2 à 12. Dans les travaux

de Martinez *et al.* (1996), ils ont rapporté que le pH optimum du FOC est inférieur à 4,5. Dans la nature, il a été isolé à partir de sol au pH compris entre 5,3 et 6,3 (Vujanovic *et al.*, 2006). Plusieurs auteurs ont constaté que les densités du FOC augmentent en pH acide et il est supprimé par l'alcalinité du milieu (Anuar *et al.*, 2008 ; Arvayo- Ortiz *et al.*, 2011).

L'effet de la lumière sur le développement de FOC n'est pas vraiment un facteur limitant contrairement à certaines espèces très exigeantes à la lumière (Setti, 1996). Les résultats obtenus, montrent que les isolats de FOC ont poussé aussi bien dans les deux conditions d'obscurité totale et en alternance avec de la lumière. En revanche, la lumière dans notre étude semble favoriser surtout la production de spores, ce qui concorde avec les résultats obtenus par Pfohl-Leszkowicz en 2001. Carlile en 1956 a démontré que la lumière favorise la formation d'un pigment orange et les microconidies. Cependant l'obscurité favorise la pigmentation rouge et violette

II.3.3. Détermination du pouvoir antagoniste antifongique *In Vitro* des rhizobactéries

Les cent cinquante-deux souches de la collection des *Bacillus* et *Pseudomonas* (80 souches de *Bacillus* et 72 souches de *Pseudomonas*) ont été confrontées en premier lieu à l'isolat FOC1 afin de mettre en évidence leur pouvoir antagoniste contre le développement des colonies fongiques *in Vitro* sur milieu PDA (figure 10).

Selon les résultats obtenus, il en ressort que les souches de *Bacillus* ont un pouvoir inhibiteur légèrement supérieur que celui obtenu par les souches de *Pseudomonas*. En effet, la moyenne de l'inhibition était égale à 39% dans le cas des *Bacillus* et uniquement 37% comme des souches de *Pseudomonas* (Tableau 12). Selon toujours ce pouvoir inhibiteur, nous avons pu classer les souches étudiés en quatre groupes distincts.

Les souches caractérisés par une inhibition fortement importante constituent le premier dont le taux est supérieur 75% ; uniquement deux souches de *Bacillus*, la B61 et B69 avec des taux d'inhibition de 77% et 76% respectivement, ce qui représente uniquement 2,5% du total des souches récoltées. Alors qu'aucune souche de *Pseudomonas* n'a atteint ce taux d'inhibition. Le deuxième groupe renferme les souches bactériennes avec un pouvoir inhibiteur jugé important compris entre 50 et 75%, on y trouve 27,50% des souches appartenant au genre *Bacillus* et 23,61% des souches appartenant au genre *Pseudomonas*.

Parmi les *Bacillus*, on cite la B13 (60%), B22 (66%), B39 (70.50%), B40 (69,50%), B45 (64%) et la B63 (68%), aussi nous citons la P4 (66%) ; P5 (63,50%) ; P53 (71%) ; P68 (65%) ; P70 (55,50%) dans le groupe des *Pseudomonas* (Tableau C, D, annexe1).

Comparativement aux deux groupes précédents, le troisième groupe caractérisé par une efficacité moyenne comprise entre 25% et 50%, est le plus pourvu et le plus riche en nombre des souches avec 41,25% des souches de *Bacillus* et 52,77% des souches de *Pseudomonas* du total des souches récoltées. Au sein de ce groupe, nous avons enregistré une inhibition de 48% pour la souche de *Bacillus* B48, B53 (40%), B52 (42%), B58 (44,5%), B70 (44%), B75 (47,5%) et 38,5% pour la souche B76. Par ailleurs, nous avons relevé une inhibition de l'ordre de 31% avec la souche de *Pseudomonas* P3, P8 (48%), P11 (45,5%), P25 (45%), P64 (45,5%), P65 (38%) et 36% avec la souche P66 (Tableau 12).

En dernier lieu, le quatrième groupe où l'inhibition a été considérée comme faible et inférieur à 25%, nous avons rencontré qu'il contient 28,75% des souches de *Bacillus* et 23,61% des souches de *Pseudomonas* du total général des souches étudiées. On ici que nous avons rencontré des souches n'ayant aucun pouvoir inhibiteur, telles que les souches B6 (0%) et B57 (0%) du genre *Bacillus*, un pouvoir inhibiteur insuffisant pour des souches comme la B7 (11%), B18 (5%), B34 (22%) et B43 (23%). Dans le cas des *Pseudomonas*, aucune souche n'a donné le score nul mais sept souches avaient un pouvoir inhibiteur très faible à savoir : P1 (10%), P17 (24%), P62 (13,5%), P28 (9%), P32 (3%), P35 (%) et la P40 (14%).

Tableau 12: Classement des souches bactériennes selon le taux d'inhibition du FOC1

Souches Bactériennes	Groupe 1 > 75%		Groupe 2 > 50% - < 75%		Groupe 3 > 25% - < 50%		Groupe 4 < 25%	
	Taux	Nbre	Taux	Nbre	Taux	Nbre	Taux	Nbre
<i>Bacillus</i>	2,50%	2	27,50%	22	41,25%	33	28,75%	23
<i>Pseudomonas</i>	0%	0	23,61%	17	52,77%	38	23,61%	17

Sur le plan statistique, l'analyse de variance au seuil 5% montre un effet significatif de l'activité antagoniste aussi bien des 80 souches de *Bacillus* que les 72 souches de *Pseudomonas* testées contre le FOC1 (Tableau 13). A partir de ces résultats, nous déduisons les souches étudiées présentent une grande variabilité.

Tableau 13: Analyse de la variance de l'effet antagoniste des souches de *Bacillus* anti-FOC1.

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	66079,061	79	836,444	25,341	0,000
Intra-groupes	2640,625	80	33,008		
Total	68719,686	159			

Tableau 14 : Analyse de la variance de l'effet antagoniste des souches de *Pseudomonas* anti-FOC1.

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	40587,433	70	579,820	20,480	0,000
Intra-groupes	2010,125	71	28,312		
Total	42597,558	141			

Il est important de signaler que toutes souches ayant donné une activité antifongique vis-à-vis du FOC1 à travers l'inhibition de son croissance mycélienne inférieure à 40% sont éliminées des analyses et des tests ultérieurs de caractérisation, soit 35 souches de *Bacillus* et 31 souches de *Pseudomonas*.

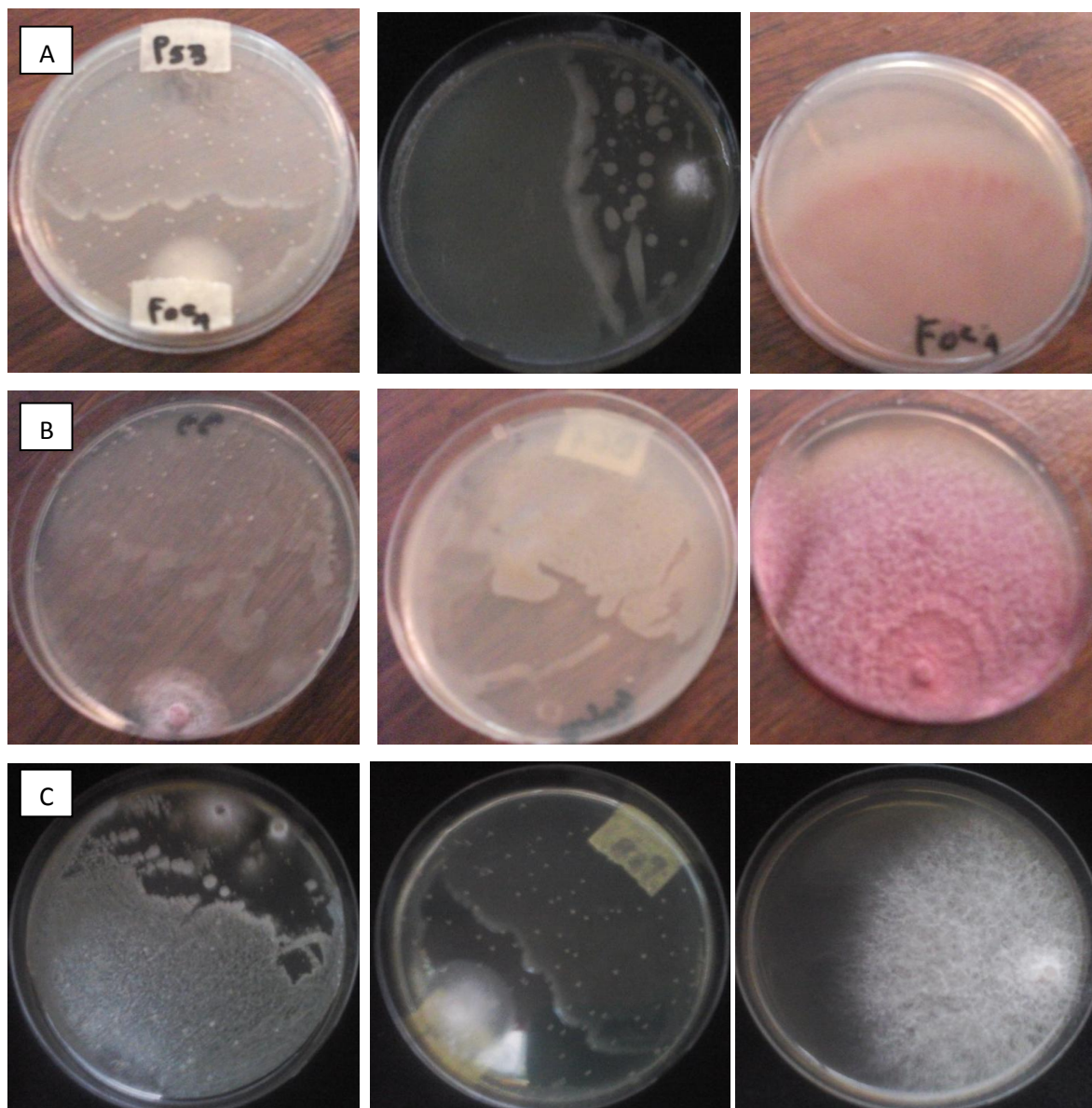


Figure 10: confrontation directe bactérie antagoniste – champignon pathogène in vitro.

A) *Aneurinibacillus aneurinlyticus* et *Pseudomonas luteola* contre le FOC1 et le témoin; B) le témoin FOC2 ; *Aneurinibacillus aneurinlyticus* et *Pseudomonas fluorescens* contre le FOC2 ; C) FOC3 témoin ; *Pseudomonas lutteola* et *Bacillus cereus* contre le FOC3.

3.3.1 Activité antagoniste des composés diffusibles envers les isolats du FOC

3.3.1.1 Le cas des souches bactériennes *Bacillus*

Les meilleurs souches bactériennes apparentant aux deux genres étudiés ayant une activité antifongique supérieure à 40% dans les tests de confrontation directe contre le FOC1 en dual culture ont été retenues pour les tests futures. Il s'avère que 35 souches de *Bacillus* et 31 souches de *Pseudomonas* correspondent aux critères d'efficacité retenus.

D'emblé, on signale la confirmation des résultats obtenus dans les tests préliminaires, ou l'inhibition de la croissance mycélienne du FOC a été réobtenue dans l'actuel test de comparaison du comportement des souches bactériennes envers les isolats du FOC.

En ce qui concerne l'efficacité des souches bactériennes dans le contrôle de la croissance mycélienne des isolats fongiques nous donnent une grande variabilité, d'une part entre les souches bactériennes et à l'intérieur du même isolat fongique et d'autre part entre l'efficacité de chaque souche bactérienne et le développement mycélien des trois isolats fongiques étudiés (Figure 11, Tableau E, annexe1).

En effet, les souches de *Bacillus* étaient très efficaces contre le FOC1 avec une moyenne d'inhibition de l'ordre de 54,63%, suivie par inhibition moyenne de l'ordre de 42,44% contre le FOC3 et seulement moyenne d'inhibition de 28% le FOC2.

A titre individuel, la souche bactérienne codée B61 s'est avéré la plus efficace contre le FOC1, FOC2 avec des taux d'inhibition de l'ordre 77% et 66,71%, respectivement. Alors que dans le cas du FOC3 la souche bactérienne B73 s'est montré la plus efficace du moment qu'elle a donné un taux d'inhibition de l'ordre 72,97% (Tableau C, annexe 1).

Comme synthèse des résultats, il en ressort que 48.5% des souches de *Bacillus* testées sont efficaces ont un pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du FOC1 supérieur à 50%, et le même pourcentage de souches (48.5%) ont un taux d'inhibition compris entre 25 et 50%. Deux souches de *Bacillus* se sont avérées très efficaces contre le FOC1 soit 2,85% du total des souches testées.

En ce qui concerne l'activité anti fongique contre le FOC2, la majorité des souches de *Bacillus* ont une activité comprise entre 25 – 50% d'efficacité soit un taux de 60% du total des souches testées. Ceci est semblable aux résultats obtenus contre le FOC3, où la majorité des souches soit 65,71% avaient une efficacité comprise entre 25 – 50%. On également que contre ces deux isolats fongiques, on n'avait trouvé aucune souche avec un pouvoir inhibiteur dépassant les 75% d'efficacité (Tableau 13).

Tableau 13: Classement des souches de *Bacillus* selon l'action par les produits diffusibles

Isolats FOC	Groupe 1 Sup à 75%	Groupe 2 Entre 50 - 75%	Groupe 3 Entre 25 – 50%
FOC1	2.85%	48.57%	48.57%
FOC2	0%	31.43%	60%
FOC3	0%	28.57%	65.71%

Les résultats de comparaison de l'inhibition de la croissance mycélienne par les souches de *Bacillus* montrent un effet significatif au seuil 5% avec les quatre isolats du Foc et avec le *Fusarium solani*. Ceci confirme aussi bien la variabilité entre les FOC et les souches de *Bacillus* (Tableau 14).

Tableau 14 : Analyse de la variance de l'effet antagoniste des souches de *Bacillus* contre trois isolats de FOC et contre le FS.

		Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inhibition_FOC1	Inter-groupes	7998,62	34	235,25	7,10	0,000
	Intra-groupes	1159,75	35	33,13		
	Total	9158,37	69			
Inhibition_FOC2	Inter-groupes	23101,80	34	679,46	132,75	0,000
	Intra-groupes	179,13	35	5,11		
	Total	23280,93	69			
Inhibition_FOC3	Inter-groupes	7022,12	34	206,53	45,28	0,000
	Intra-groupes	159,62	35	4,56		
	Total	7181,75	69			
Inhibition_FS	Inter-groupes	17388,33	34	511,42	43,05	0,000
	Intra-groupes	415,72	35	11,87		
	Total	17804,05	69			

II.3.3.1.2. Le cas des souches bactériennes *Pseudomonas*

Comme dans le cas des *Bacillus*, les souches de *Pseudomonas* ont donné des résultats similaires aux résultats des tests préliminaires, ou l'inhibition de la croissance mycélienne du FOC a été réobtenue dans l'actuel test de comparaison du comportement des souches bactériennes envers les isolats du FOC. (Figure 9).

En ce qui concerne l'efficacité des souches bactériennes dans le contrôle de la croissance mycélienne des isolats fongiques nous donnent une grande variabilité, d'une part entre les souches bactériennes et à l'intérieur du même isolat fongique et d'autre part entre l'efficacité de chaque souche bactérienne et le développement mycélien des trois isolats fongiques étudiés.

En effet, les souches de *Pseudomonas* étaient très efficaces contre le FOC1 et le FOC2 avec la même moyenne d'inhibition de l'ordre de 47,26%, très loin de la moyenne d'inhibition de l'ordre de 25,40% obtenue dans le cas du FOC3. A titre individuel, la souche bactérienne codée P53 s'est montrée la plus efficace pour le contrôle du FOC1 avec un taux de 71% mais totalement inactive contre le FOC2 (0%), qui était beaucoup plus sensible à la souche P25 avec un taux d'inhibition de l'ordre de 71,42%. Alors que dans le cas du FOC3, c'est la souche bactérienne P37 qui s'est montrée la plus efficace puisqu'elle a donné un taux d'inhibition de l'ordre 56,75% (Tableau D, annexe 1).

Comme synthèse des résultats, il en ressort que globalement, il n'existe aucune différence dans le nombre de souches de *Pseudomonas* agissant contre les trois isolats du FOC. Primo aucune n'a donné un pouvoir inhibiteur supérieur à 75% d'inhibition quelque soit l'isolat fongique, secundo, on a obtenu le même nombre de souches bactériennes ayant une inhibition comprise entre 25 et 50% de réduction de la croissance mycélienne. Un nombre plus ou moins réduit (25,80) de souches ayant une activité comprise entre 50 et 75% anti FOC2 est à signaler (Tableau 16).

Tableau 16: Classement des souches de *Pseudomonas* selon l'action par les produits diffusibles

Souche bactériennes	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
FOC1	0%	29.03%	70.97%
FOC2	0%	25.80%	70.97%
FOC3	0%	29.03%	70.97%

L'analyse de la variance au seuil de 5% a montré un effet significatif de l'activité antagoniste des 31 souches de *Pseudomonas* contre les trois isolats de FOC et contre le FS (Tableau 17).

Tableau 17 : Analyse de variance de l'effet antagoniste de souches de *Pseudomonas* contre les isolats fongiques.

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Souches_ <i>Pseudomonas</i>	18251,47	30	608,38	12,03	0,000
Isolats_FOC	9426,29	3	3142,09	62,15	0,000
Souches_ <i>Pseudomonas</i> * Isolats_FOC	38978,66	90	433,09	8,56	0,000
Erreur	6268,67	124	50,55		
Total	513575,53	248			
Total corrigé	72925,10	247			

II.3.3.1.3. Activité antagoniste des *Bacillus* et *Pseudomonas* envers le *Fusarium solani*

Afin d'étudier l'effet des souches bactériennes sur d'autres espèces de *Fusarium*, nous avons confronté les souches bactériennes sélectionnées dans des tests *In Vitro* contre le *F. solani*. Les résultats, nous donnent que les souches bactériennes (*Bacillus* et *Pseudomonas*) exercent une activité antagoniste envers cette espèce de *Fusarium*.

En effet, les souches de *Bacillus* ont donné une moyenne d'inhibition de l'ordre 43,129. Elle est parfois plus sensible par rapport au FOC2 à l'activité antifongique des souches bactériennes du groupe de *Bacillus*. Il se trouve que la souche B61 qui était la meilleure contre le FOC1 et FOC2, s'est montré la plus efficace dans l'inhibition de la croissance mycélienne du *Fusarium solani*.

Dans le cas des souches de *Pseudomonas*, elles ont donné une moyenne d'inhibition de l'ordre 39,5, ce taux se trouve plus supérieur qu'au taux enregistré avec le FOC3, qui est égale à 25,4. Individuellement, la souche P29 s'est montré la plus efficace dans l'inhibition de la croissance mycélienne du *Fusarium solani* avec un taux d'inhibition de la croissance mycélienne de l'ordre de 67,5.

II.3.3.2 Activité antagoniste des composés volatiles envers les isolats du FOC

II.3.3.2.1. Le cas des souches bactériennes *Bacillus*

L'étude de l'antagonisme *in Vitro* pour la mise en évidence d'une activité de composés volatiles des souches bactériennes sélectionnées ont été effectués dans des tests appropriés. Les résultats de cette étude nous confirment la distinction des souches bactériennes de *Bacillus* dans la production de composés volatiles ayant antagoniste très importante. En effet, il existe une activité qui est très proche dans l'inhibition de la croissance mycélienne des FOC2, FOC3 avec des taux de l'ordre de 51,66 ; 53,37, respectivement. Soit une légère variabilité par rapport aux obtenu avec le qui est égal à 42,315.

A titre individuel, les souches B39 et B42 qui se sont avérées, les deux meilleures souches inhibitrices de la croissance du FOC1 avec un pourcentage 70,50. En ce qui concerne le FOC2, c'est la souche B61 qui a donné le meilleur taux d'inhibition de 72,72, et c'est montré aussi efficace contre le FOC3 avec 72,30. Paradoxalement, elle est la moins efficace contre le FOC1 avec uniquement 9% d'inhibition de la croissance mycélienne. Enfin, la souche B78 s'est montrée la plus efficace contre le FOC3 avec un taux de l'ordre de 73,84 (Tableau E, annexe 1).

Par ailleurs, on signale que certaines souches de *Bacillus*, n'ont montré qu'un léger pouvoir antagoniste avec les produits volatiles le cas des souches B61 qui a donné un taux d'inhibition de l'ordre de 9 contre le FOC1, 12,72 avec B41 contre le FOC2 et 21,53 avec B40 contre le FOC3 (Tableau 18).

Si l'on compare le pouvoir antagoniste des souches de *Bacillus* à travers l'activité des produits diffusibles et les composés volatiles, on trouve que le FOC1 est plus sensible aux produits diffusibles l'exemple des enzymes, antibiotiques et métabolites secondaires. Où les souches ont donné des taux d'inhibition de 54,62 avec les composés diffusibles et 42,32 avec les composés volatiles. Alors que les FOC2 et FOC3 sont plus sensibles aux composés volatiles tel que l'HCN, où on eu comme taux d'inhibition de l'ordre 28 et 42,44 dans le cas des produits diffusibles et 51,67 et 53,38, respectivement (Figure 11).

Dans le cas d'action par les composés volatiles, aucune souche de *Bacillus* n'est distinguée par une inhibition très importante supérieure à 75%. La majorité des souches soit 61,74% ont activité inhibitrice Anti FOC1 comprise entre 25 et 50% et 31,43% des souches ont un effet inhibiteur important entre le 50 et 75%. Par contre, contre le FOC2, on trouve que 62,85% des souches de *Bacillus* ont une activité inhibitrice comprise entre 50 et 75%, et uniquement 31,43% des souches avaient un effet inhibiteur moyen par les composés volatiles. En dernier lieu, contre le FOC3, le nombre de souches ayant une activité inhibitrice importante (51,43%) est légèrement supérieure au nombre de souches ayant une activité inhibitrice moyenne (45,71%).

Tableau 18: Classement des souches de *Bacillus* selon l'action par les composés volatiles.

Souche bactériennes	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
FOC1	0%	31,43%	65,74%
FOC2	0%	62,85%	31,43%
FOC3	0%	51,43%	45,71%

Sur le plan statistique, l'analyse de la variance montre un effet significatif au seuil de 5% de l'inhibition de la croissance mycélienne des FOC par les souches de *Bacillus* à travers les produits volatiles (Tableau 18).

Tableau 19 : Analyse de variance de l'effet inhibiteur des souches de *Bacillus* par les produits volatiles

		Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inhibition_FOC1	Inter-groupes	14252,82	34	419,20	16,78	0,000
	Intra-groupes	874,25	35	24,97		
	Total	15127,07	69			
Inhibition_FOC2	Inter-groupes	16336,44	34	480,48	12,14	0,000
	Intra-groupes	1385,00	35	39,57		
	Total	17721,44	69			
Inhibition_FOC3	Inter-groupes	12614,12	34	371,00	5,95	0,000
	Intra-groupes	2173,88	35	62,11		
	Total	14788,01	69			

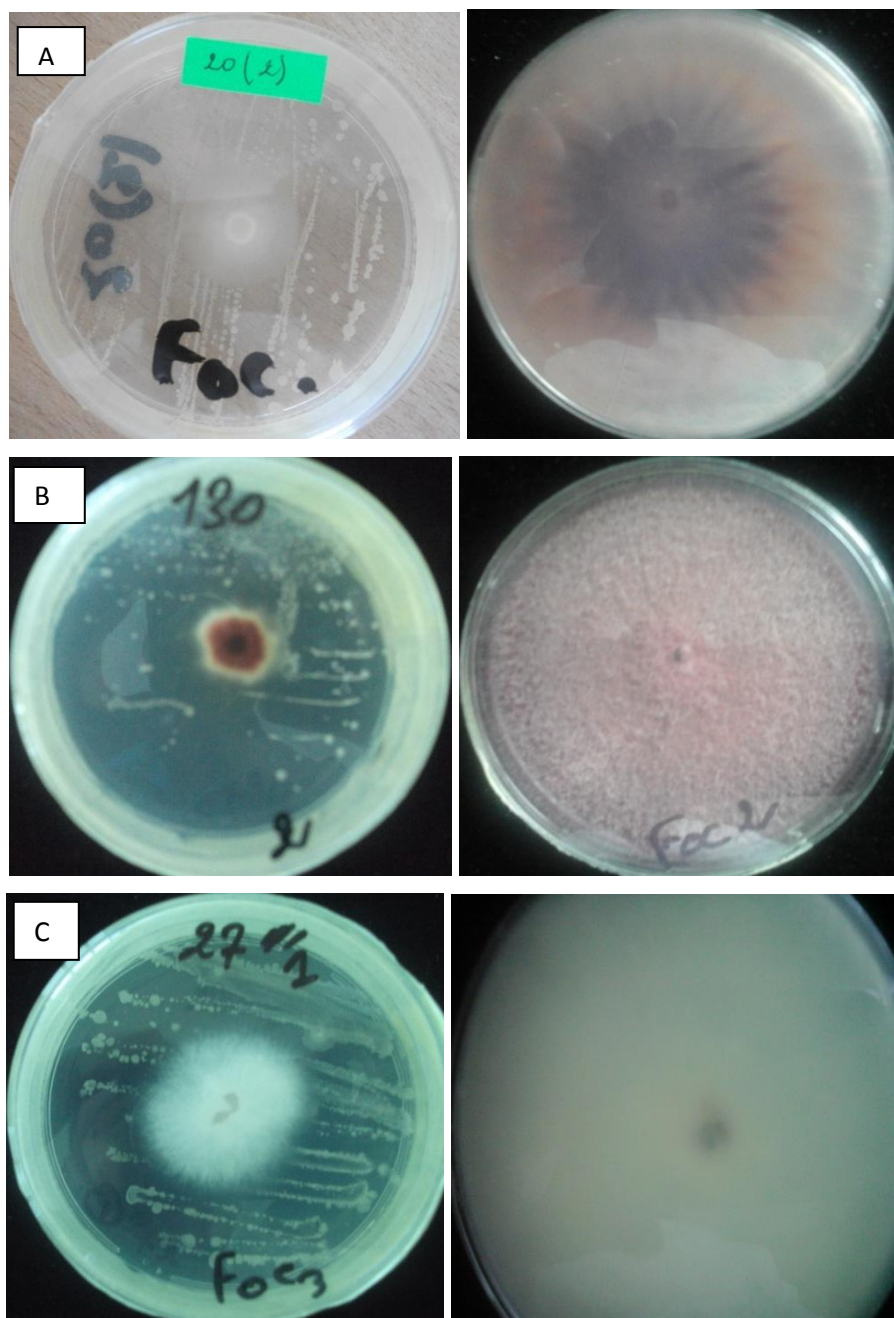


Figure 11: Inhibition de la croissance mycélienne par les produits volatiles. A) *Bacillus circulans* contre le FOC1 et le témoin ; B) la souche B60 contre le FOC2 et le témoin FOC2 ; C) *Brevisbacillus laterosporus* contre le FOC3 et le témoin FOC3.

II.3.2.2. Le cas des souches bactériennes *Pseudomonas*

L'étude de l'antagonisme *in Vitro* pour la mise en évidence d'une activité de composés volatiles des souches bactériennes sélectionnées ont été effectués dans des tests appropriés. Les résultats de cette étude nous confirment la distinction des souches bactériennes de *Pseudomonas* dans la production de composés volatiles ayant antagoniste très importante. En effet, il existe une activité qui est très proche dans l'inhibition de la croissance mycélienne des FOC2 et FOC3 avec des taux de l'ordre de 50,948 et 48,042, respectivement. Soit une légère variabilité par rapport aux obtenu avec le FOC1 qui est égal à 40,661 (Tableau 20).

A titre individuel, la souche P41 qui s'est avéré, la meilleure souche inhibitrice de la croissance du FOC1 avec un pourcentage 77,50. En ce qui concerne le FOC2, c'est la souche P69 qui a donné le meilleur taux d'inhibition de l'ordre 80 alors que la souche P64 qui s'est montré la plus efficace contre le FOC3 avec un taux de l'ordre de 78,46 (Tableau F, annexe1).

Par ailleurs, on signale que certaines souches de *Pseudomonas*, n'ont montré qu'un léger pouvoir antagoniste avec les produits volatiles le cas des souches P59 qui a donné un taux d'inhibition de l'ordre de 4 contre le FOC1, 9,84 avec P44 contre le FOC3 et 27,27 avec P3 contre le FOC2 (Tableau 20).

Si l'on compare le pouvoir antagoniste des souches de *Pseudomonas* à travers l'activité des produits diffusibles et les composés volatiles, on trouve que le FOC1 est plus sensible aux produits diffusibles l'exemple des enzymes, antibiotiques et métabolites secondaires. Où les souches ont donné des taux d'inhibition de 47,26 avec les composés diffusibles et 40,66 avec les composés volatiles. Alors que les FOC2 et FOC3 sont plus sensibles aux composés volatiles tel que l'HCN, où on eu comme taux d'inhibition de l'ordre 47,26 et 25,4 dans le cas des produits diffusibles et 50,95 et 48,04, respectivement.

On conclue que les trois isolats du FOC se comportent de la même manière envers les souches bactériennes des deux genres *Bacillus* et *Pseudomonas*.

Dans le cas d'action par les composés volatiles, contrairement aux souches de *Bacillus*, certaines souches de *Pseudomonas* se distinguent par une inhibition très importante supérieure à 75% contre les trois isolats de FOC, avec des pourcentages de souches de l'ordre de 3,22%, 6,45% et 3,22% anti FOC1, FOC2 et FOC3, respectivement.

Par ailleurs, si anti FOC2 et anti FOC3, le nombre de souches ayant des activités inhibitrices moyennes et importantes sont égales, en revanche, nous avons obtenus un nombre beaucoup plus important (64,51%) ayant une activité inhibitrice moyenne anti FOC1.

Tableau 20 : Classement des souches de *Pseudomonas* selon l'action par les composés volatiles.

Souches bactériennes	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
FOC1	3,22%	29,03%	64,51%
FOC2	6,45%	48,39%	48,39%
FOC3	3,22%	48,39%	48,39%

Statistiquement, l'analyse de la variance de l'effet inhibiteur des *Pseudomonas* par les composés volatiles est significative au seuil 5% aussi bien au sein de l'activité antifongique des souches de *Pseudomonas* que la sensibilité des isolats des FOC testés. De même pour l'interaction des deux qui a résulté significative (Tableau 21).

Tableau 21 : Analyse de la variance de l'effet des composés volatiles sur la croissance des FOC.

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Souches_Pseudomonas	31133,945	30	1037,798	29,682	0,000
Isolat_FOC	1857,193	2	928,596	26,559	0,000
Souches_Pseudomonas * Isolat_FOC	30112,696	60	501,878	14,354	0,000
Erreur	3251,646	93	34,964		
Total	462302,200	186			
Total corrigé	66355,481	185			

II.3.3.2.3. Comparaison des pouvoirs antagonistes des *Bacillus* et *Pseudomonas*

Les résultats de l'action par les produits diffusibles est presque identique entre le groupe des *Bacillus* et celui des *Pseudomonas*, avec une moyenne d'inhibition de 41,69 et 39,97%, respectivement. En revanche, les isolats de *Bacillus*, ont une action par les composés volatiles, légèrement supérieure à celle des *Pseudomonas* avec des moyennes d'inhibition de 49,12% et 46,55, respectivement.

D'une manière générale, l'action par les composés volatiles (49,12% et 46,55%) est beaucoup plus importante que celle obtenue à travers l'action par les produits diffusibles (41,69% et 39,97%), ceci, avec les deux groupes de bactéries testées (Figure 12).

En ce qui concerne la sensibilité des isolats du FOC aux différentes substances produites par les Bactéries, il en ressort qu'il existe une légère différence dans la sensibilité

entre les trois isolats de FOC rencontrés. En effet, le FOC1 (46,22%) subit plus l'action des deux bactéries que le FOC2 (44,47), qui à son tour est plus sensible que le FOC3 (42,32%).

La sensibilité accrue du FOC1 comparativement aux deux isolats vient beaucoup plus par l'action des produits diffusibles (50,94%) alors que celle des FOC2 et FOC3 est due principalement des composés volatiles (51,31 et 50,71) respectivement (Tableau 22).

Tableau 22: Comparaison des pouvoirs antagonistes entre les *Bacillus* et *Pseudomonas*

Genre	Composés	FOC1	FOC2	FOC3	Moyenne
<i>Bacillus</i>	Diffusibles	54,62	28	42,44	41,69
<i>Pseudomonas</i>	Diffusibles	47,26	47,26	25,4	39,97
<i>Bacillus</i>	Volatiles	42,32	51,67	53,38	49,12
<i>Pseudomonas</i>	Volatiles	40,66	50,95	48,04	46,55
Moyennes		46,22	44,47	42,32	

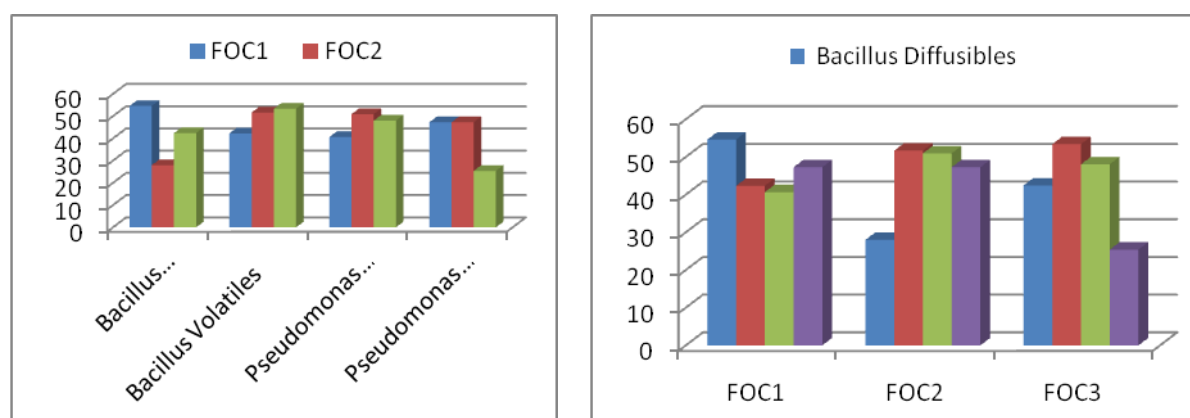


Figure 12: Comparaison des pouvoirs antagonistes en fonction des souches de *Bacillus* et *Pseudomonas* et des isolats du *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*

Le *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris* est économiquement un agent pathogène important sur les cultures de pois chiche. En raison de la nature de l'agent pathogène de la maladie, les applications chimiques pour lutter contre la maladie sont rarement couronnées de succès. La présente étude a été menée pour évaluer l'efficacité de *Pseudomonas* et les *Bacillus* contre des souches de *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*. Les souches bactériennes sont dans la plupart des cas corrélées et plus efficaces dans l'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris* isolé, si elles ont la même origine agro-écologique ; ce qui les rend très efficaces dans la lutte biologique. Nos résultats corroborent avec ceux de Weller

(1988) qui stipulent que l'utilisation de rhizobactéries dans le contrôle des maladies des plantes est plus efficace lorsque les rhizobactéries ont été isolés à partir de la même rhizosphère de la plante hôte. Dans cette étude, tous les isolats bactériens ont été sélectionnés parmi rhizosphère de champs de pois chiches.

L'ensemble de la collection des *Bacillus* et *Pseudomonas* a été testé afin de mettre en évidence l'activité antifongique des souches isolées vis-à-vis de FOC1, par la technique de confrontation directe, cette technique est une méthode de diffusion en milieu gélosé simple et rapide. Certains isolats bactériens ont montré une forte activité d'inhibition du pathogène, alors que d'autres n'ont montré qu'une activité légère voire nulle dans certains cas. Environ 43,42% (66 sur 152) des isolats a montré une activité antagoniste importante contre le *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris* dans des tests in vitro et donnant plus de 40% d'inhibition de la croissance du mycélium. Le reste des isolats testés ne présentait aucune ou une faible activité antagoniste contre l'agent pathogène sur PDA plaque test. Des résultats similaires ont déjà été rapportés (Erdogan et Benlioglu , 2010; Tjamos et al 2004; Khot *et al* 1996).

Les souches bactériennes (*Bacillus* et *Pseudomonas*) exercent une activité antagoniste envers le *Fusarium solani*. En effet, les souches de *Bacillus* ont donné une moyenne d'inhibition de l'ordre 43,129. *F.solani* plus sensible par rapport au FOC2 à l'activité antifongique des souches bactériennes du groupe de *Bacillus*. Dans le cas des souches de *Pseudomonas*, elles ont donné une moyenne d'inhibition de l'ordre 39,5, ce taux se trouve plus supérieur qu'au taux enregistré avec le FOC3, qui est égal à 25,4. Mudawi et Idris en 2014 ont trouvé que le FOC était plus sensible que *Fusarium solani*.

La réduction de la croissance fongique par certains PGPR et la formation de zones d'inhibition étaient vraisemblablement en raison des métabolites, des substances antifongiques et ou des enzymes dégradant la paroi cellulaire, libérées par les bactéries dans le milieu de culture (Zarrin *et al* (2009). Également Sarhan *et al* (2001) et Montealegre (2005) signalent que le filtrat de culture exempt de cellules de *B. subtilis* a inhibé la croissance mycélienne, la croissance radiale et la germination des spores et le tube germinative du FOC.

Les résultats de l'antagonisme in vitro indiquent que la production d'antibiotiques et/ou d'autres substances antifongiques par ces bactéries peut être impliquée dans l'inhibition de la croissance des hyphes des isolats fongiques. Ceci est soutenu par les éléments: a) tous les isolats bactériens sélectionnés au départ, il n'y a pas de contact direct entre le mycélium et les colonies bactériennes, de sorte que l'inhibition de la croissance fongique est due à la substance diffusée dans le milieu de gélose. b) Le milieu PDA utilisé pour la confrontation

directe est riche en nutriments et donc la concurrence pour eux pourrait être exclue. Et c) l'antibiose est le mode général d'antagonisme observé pour *Bacillus spp* (Landa, 1997).

De nombreuses souches de *Bacillus* ont été trouvés être des agents de lutte biologique contre les agents pathogènes fongiques potentiels. Cette action antifongique implique la production d'antibiotiques, en particulier dans les microsites de sol (Fravel, 2005).

Adebayo et Ekpo (2005) indiquent que le *B.sutilis* a inhibé la croissance fongique et également favorisé la croissance des plants de tomates en culture sous serres. Le *B. subtilis* a montré avoir un large spectre d'activité antimicrobienne sur divers champignons et bactéries pathogène (Grover *et al.*, 2009). Les *Bacillus* sont connus pour leur faculté de réduction de l'indice de flétrissement en *Fusarium udum*, augmenter la croissance des plantes et provoquent la colonisation rapide des tissus de tomate dans l'ordre d'induire une résistance systémique contre *F.oxysporum* (Kloepper, 2004). Alors que les *Pseudomonas* sont très efficaces contre le *F.solani* (61,29% des isolats ont un taux d'inhibition plus de 50%) par rapport aux isolats de *Bacillus* (34,29%). 29,03% des souches de *Pseudomonas* ont donné des taux d'inhibition supérieurs à 50%. Ceci nous laisse à affirmer que le FOC était plus résistant aux isolats de *Pseudomonas* que FS. Les *Pseudomonas* fluorescents ont montré un grand potentiel dans la suppression du flétrissement de pois chiche, ce qui suggère que ces isolats peuvent être utilisés comme agents de lutte biologique contre les champignons phytopathogène des plantes (Alabouvette., 2007).

Les résultats de l'action des produits diffusibles est identique entre les *Bacillus* et les *Pseudomonas*, avec les produits volatiles, les isolats de *Bacillus* légèrement supérieur à ceux de *Pseudomonas*, ce qui va à l'encontre des résultats obtenus par (Karimi *et al.*, 2012). Les résultats in vitro illustrent bien que toutes souches de *B.subtilis* isolées produisent plus de métabolites secondaires extracellulaires que les souches de *Pseudomonas*. Ces résultats sont en accord avec les recherches précédemment effectuées par Romanenko *et al* (2000) et Kamal et al (2009). Les résultats des composés volatiles et la production de cyanure d'hydrogène ont été similaires dans les deux des *Pseudomonas* et *Bacillus*. Le Cyanure d'hydrogène est un agent chélateur des métaux et a été signalé aussi efficace dans le contrôle du flétrissement du concombre causée par *Pythium ultimum* (Keel *et al.*, 1996).

II.4. Conclusion :

Au terme de cette partie d'étude, qui analysée la pouvoir antagoniste in vitro de 152 souches bactériennes affiliées aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas*, une vingtaine de souches par genre se sont montrés très efficace dans l'inhibition de la croissance mycélienne du douées des 4 isolats du *Fusarium oxysporum f.s. ciceris*, donnant parfois un taux de 70% d'inhibition. Nous avons remarqué qu'il existe une grande variabilité entre les souches bactériennes et les isolats fongiques. Si certaines ont montrées une forte activité d'inhibition du pathogène, d'autres n'ont montré qu'une activité légère, voire nulle dans certains cas. Environ 43,42% des souches soit 66 sur 152 testées, avait montré une activité antagoniste intéressante contre le FOC. Par ailleurs, nous concluons que l'efficacité des souches bactériennes augmente si la souche a la même origine agro-écologique que l'isolat fongique.

L'inhibition de la croissance mycélienne du FOC est le résultat de l'action combinée d'un certains nombre de composés diffusibles et volatiles. En effet, nos résultats montrent que l'action par les produits diffusibles dans le milieu de culture est très proche entre le groupe des *Bacillus* et des *Pseudomonas* et les espèces apparentées. En revanche, l'action par les produits volatiles des souches de *Bacillus* est plus prononcée que celle obtenue avec les souches de *Pseudomonas*. En outre, la sensibilité des isolats du FOC aux différentes substances produites par les bactéries, elle à l'avantage des produits volatiles.

La réduction de la croissance mycélienne par les rhizobactéries à travers la formation de zones d'inhibition autour des colonies fongiques est du vraisemblablement aux métabolites, aux substances antifongiques et ou aux enzymes dégradant la paroi cellulaire, libérées par les bactéries dans le milieu de culture. L'exploitation de la faculté antagoniste des *Bacillus* et des *Pseudomonas* dans le biocontrôle de la fusariose de pois chiche semble être très prometteuse.

Chapitre III

*Biocontrôle de la fusariose du pois
chiche par les rhizobactéries In planta*

Chapitre III : Biocontrôle de la fusariose du pois chiche par les rhizobactéries *In planta*

III.1. Introduction

La fusariose, causée par *Fusarium oxysporum* Schlechtend . *f.sp. ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato (*F.o. ciceris*), est un obstacle majeur à pois chiche (*Cicer arietinum* L.) dans le monde entier et en particulier dans le sous-continent indien et le bassin méditerranéen. Les pertes de rendement de pois chiches en raison de la fusariose sont estimées à 10 % en Inde et en Espagne, 40 % en Tunisie et 17% en Iran (Bousslama, 1980; Jamali *et al.*, 2004) . Il y a huit races de *F. oxysporum f. sp. ciceris* (0 , 1A, 1B / C , 2 , 3, 4 , 5 et 6) qui sont identifiés par réaction sur un ensemble de cultivars de pois chiches différentiels (Jimenez- Gasco et Jimenez- Diaz , 2003; Haware et Nene , 1982) . La méthode la plus efficace pour la gestion des maladies utilise des cultivars résistants (Jimenez- Gasco et Jimenez- Diaz, 2003; Navas - Cortés *et al*, 1998), bien que de nouvelles races du pathogène semblent surmonter gènes résistants. En outre, la lutte chimique est pas satisfaisante, donc la lutte biologique est une alternative à la lutte chimique de la maladie (Anjajah *et al.*, 2003; Landa *et al.*, 2004).

L'utilisation d'agents de lutte biologique, tels que les rhizobactéria (PGPR), peut être une approche appropriée dans le contrôle des maladies (Schmidt *et al.*, 2004). Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR), tels que les souches de *Pseudomonas* et *Bacillus*, sont les principaux colonisateurs de racines (Manikanda *et al*, 2010; Joseph *et al*, 2007), et peuvent obtenir des défenses de la plante (Kloepper *et al.*, 2004). Différents mécanismes ont été signalés pour leur performance tels que la production d'antibiotiques, les sidérophores la cyanure d'hydrogène, la concurrence pour la nutrition et de l'espace, la résistance induire, l'inactivation des enzymes de pathogènes et l'amélioration des racines et développement des plantes (Intana *et al*, 2008 ; Weller, 1988). Des souches de *Pseudomonas* et de *Bacillus* ont un grand potentiel dans le contrôle de la fusariose du pois chiche (Anjajah *et al.*, 2003; Hervas *et al.*, 1997; Landa et al, 1997).

Dans ce chapitre on déterminée la virulence des isolats de FOC sur cinq différentes variétés de pois chiche, et l'évaluer les effets antagonistes de certains souches sélectionnés sur *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris* dans des conditions de serre.

III.2. Matériels et méthodes

III.2.1. Etude de la pathogénicité des isolats du FOC

III.2.1.1. Préparation de matériel fongique (l'inoculum)

Pour obtenir un mode d'inoculation qui puisse être valable, nous avons employés une technique couramment utilisée pour obtenir les champignons de sol (Rouhani, 1978).

Les isolats ont été ensemencés chacun dans des boites de Pétri contenant du PDA, suivie par une incubation à 25°C pendant une semaine. Au bout de 8 jours, les champignons ayant suffisamment poussé peuvent envahir toute la boite.

L'inoculum est préparé par suspension de tout le contenu de la boite de pétri dans de l'eau distillé stérile est porté par la suite à une bonne agitation. La suspension ainsi recueillie, la concentration de l'inoculum est ajustée à 10^6 spores/ml après comptage à l'aide de la cellule de Malassez. Cette concentration est suffisante pour reproduire les même symptômes observés au champ (Sharma et Muehlbauer, 2007 ; Westerlund *et al*, 1974).

III.2.1.2. Préparation du matériel végétal

Les semences de cinq variétés de pois chiche sont tout d'abord désinfectées à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 12% pendant 2 à 3 minutes. Les semences sont par la suite mises à germer pendant 4 à 5 jours à 25°C dans des boites de pétri stérile sur du papier filtre humidifié avec de l'eau stérile. Après la germination, les graines sont placées dans des pots en plastique d'une contenance de 1000ml, perforés de quelque trous, afin d'éviter les engorgements lors des arrosages. Ces pots ont été remplis avec un substrat de culture composé d'un tiers de sol, un tiers de sable et un tiers de terreau. Le tout a été préalablement stérilisé à une température de 120°C pour éliminer toutes traces de microorganismes pouvant interférer avec l'activité du FOC.

Chaque pot a été ensemencé avec trois graines d'une variété de pois chiche et chaque variété a été semée dans trois pots faisant l'objet de répétition. Les pots sont alors placés dans la face la plus exposée au soleil du laboratoire afin d'assurer les conditions de développement les plus favorables à la culture : température comprise entre 12 - 15°C la nuit et 22 – 26°C le jour et un ensoleillement avec une photopériode printanière de la région de Sétif. Les pots sont espacés de 5 cm environ et les plantules issues sont arrosées 2 à 3 fois par semaines.

III.2.1.3. Technique d'inoculation des plantules de pois chiche

Les plantules de chaque variété de pois chiche âgées de 8 jours sont inoculées par injection au niveau des racines d'une suspension conidienne égale à 10^6 spore/ml (El Aoufri,

2001 ; Trapero-Casas, 1983 ; Westerlund *et al.*, 1974). Les plantules de pois chiche témoins sont traitées de la même manière avec seulement l'injection de l'eau distillée stérile. Après inoculation, les plantules sont examinées régulièrement pour le développement d'éventuels symptômes durant une période de 40 jours.

III.2.2. Etude de l'activité antagoniste *in planta*

La mise en évidence de l'antagonisme *in situ*, il s'agit de mettre en contact la souche bactérienne ayant montré une activité antagonistique intéressante *in vitro* avec les isolats les plus virulents du FOC en présence des variétés les plus sensibles du pois chiche.

III.2.2.1. Préparation de l'inoculum bactérien

En effet, les souches bactériennes choisies ont été concentrées dans des flacons erlenmeyer de 250ml contenant 100ml du bouillon King B stérile et du BN et sont portés à une agitation de 120rpm pour 48h. Les cellules bactériennes sont par la suite centrifugées à 12000g à une température de 20°C pendant 10min. Les culots produits ont été suspendus dans 10ml d'eau distillée stérile et ajusté à une concentration de 1×10^8 CFU/g (Kaur, 2003).

III.2.2.2. Préparation de l'inoculum fongique

Le FOC pathogène était multiplié à $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ dans des flacons erlenmeyer de 250 ml contenant le milieu du maïs (20g de maïs, 20g le sable et le distillée stérilisés de 30ml). Pendant 14 jours à 25°C (Kaur *et al.*, 2007).

III.2.2.3. Traitement des graines avec les antagonistes

Les variétés de pois chiche fortement sensible, Var 1 et Var 2 ont été employé pour des essais biologiques. Les graines certifiées étaient stérilisées superficiellement avec une solution de NaCl à 3% pendant 5 minutes, puis elles sont rincées trois fois dans l'eau distillée stérile et séchées sur du papier absorbant. Les suspensions des isolats bactériens ont été au départ mélangées avec la cellulose carboxyméthylrique (CMC) qui agit comme substance collante et sont agitées pendant 2h à 100tr/mn avant l'utilisation (Kaur *et al.*, 2007).

Les semences de pois chiche des variétés sensibles ont été enrobées avec les suspensions bactériennes-methylcellulose obtenues auparavant pendant une nuit entière. Les graines sont par la suite séchées à l'air sec dans des conditions stériles. En ce qui les témoins des mêmes variétés, ils ont été uniquement enduites du methylcellulose (1%) (Kaur, 2003).

III.2.2.4. Traitement du sol par le pathogène

Le même substrat de sol utilisé pour le test de pathogénicité a été utilisé pour le test d'antagonisme *in situ*. Une fois le substrat de sol stérilisé, il a été infecté artificiellement trois jours avant le semis des graines de pois chiche avec les isolats virulents du FOC auparavant développées sur le milieu de sable et de maïs. Les suspensions fongiques ont été ajustées à une concentration de 10^6 CFU/g avant leur application dans le sol (Dileep Kumar, 1999).

Trois jours après l'infection artificielle du substrat, chaque pot a reçu 3 – 5 graines d'une variété de pois chiche enrobées avec un isolat bactérie. Chaque combinaison variété – isolat du Foc – isolat bactérien a été répété trois. Pour les témoins, trois pots par variété de pois chiche ont reçus des semences enrobées avec des isolats bactériens uniquement.

Les plantes issues ont été suivies régulièrement pour noter le comportement des variétés testées vis-à-vis de l'interaction isolat pathogène – bactérie antagoniste. L'incidence des flétrissements a été notée au fur et à mesure de la croissance des plantes, alors que la longueur de la racine, sa biomasse, la phénologie de la plante (nombre de ramification, longueur de la partie végétative, longueur de la partie racinaire, poids frais du système racinaire et poids frais du système végétatif) ont été estimés après 4 – 5 semaines de culture après la date d'ensemencement (Kaur *et al.*, 2007).

III.2.3. Etude de l'effet PGPR des rhizobactéries

Afin d'étudier l'effet PGPR des rhizobactéries appartenant aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas*, nous avons utilisées les mêmes souches bactériennes étudiées auparavant dans la détermination de l'antagonisme antifongique. Le même dispositif expérimental a été adopté que précédemment, à la différence, le substrat sol n'a pas été infecter artificiellement par le *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*.

III.2.4. Traitement des résultats et analyse statistique

Les résultats obtenus ont été traités statistiquement à travers l'analyse de la variance (ANOVA) au seuil de 5% en se basant sur le SPSS.20. Aussi, les moyennes des différents paramètres mesurés ont été comparées et des histogrammes ont été développés (Excel, 2010).

III.3. Résultats et discussion

III.3.1. Etude de la pathogénicité des isolats du *Foc*

L'étude de la pathogénicité a visé en premier lieu la détermination du niveau d'infection des plantes et la virulence de quatre isolats de *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris* vis-à-vis de quatre variétés de pois chiche. Ceci va nous permettre d'établir d'une part un classement selon la sensibilité ou la résistance des variétés et d'autre part la virulence des isolats du *Foc*. Ce double objectif serait atteint sur la base de mesures effectuées sur un ensemble de paramètres de croissance après huit (8) semaines de culture après le semis.

III.3.1.1. Effet des isolats du *Foc* sur le nombre de ramification

Le calcul du nombre moyen de ramification des plants traités a été égal à 13,48. Il varie entre un minimum de 10 ramifications par plant obtenu avec la variété Flip 05-156C lorsqu'elle est infectée par le *Foc4* et un maximum de 17,67 ramifications par plant observé avec la variété Flip 93-93C lorsqu'elle est infectée par le *Foc1*. Pour le reste des variétés leurs moyennes sont intermédiaires entre ces deux groupes (figure 12, Tableau G, annexe 1).

La variété Flip 05-156C s'est montrée la plus sensible, c'est celle qui a subi le plus les attaques des différents isolats du *Foc* avec une moyenne de 11,67 ramifications/plant. En revanche, la variété Flip 93-93C semble être la plus résistante avec une moyenne de 15,17 ramifications/plant.

Sur le plan virulence des isolats du *Foc*, le *Foc 4* est le plus virulent sur les variétés de pois chiche testées où la moyenne des ramifications était égale à 12,33. Par contre le *Foc 2* semble être le moins virulent avec une moyenne de 14,58 ramifications/plant (figure 13).

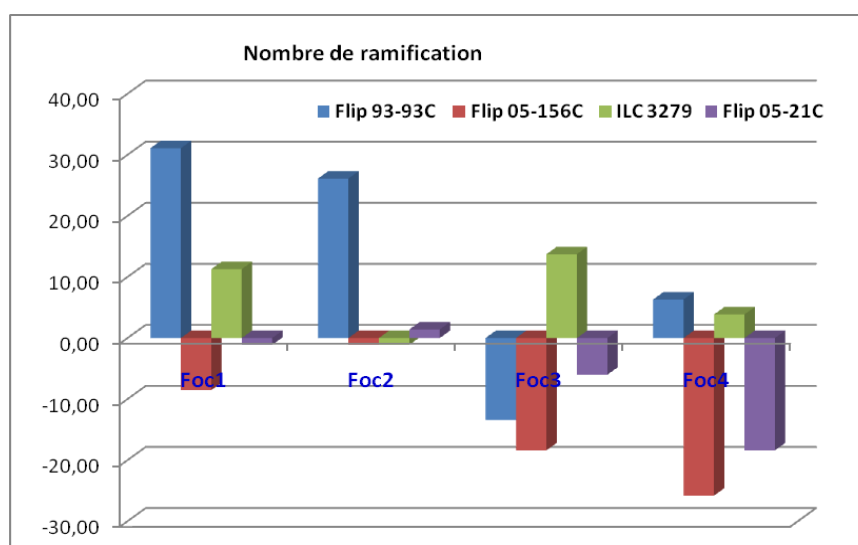


Figure 13: Nombre de ramification en fonction des isolats et des variétés

Sur le plan statistique, l'analyse de la variance univariée au seuil de 5% a montré un effet variété et isolats du Foc significatif, alors que l'interaction (variété x isolat FOC) n'est pas significative (Tableau 23) (figure 14). En plus, la variabilité au sein des isolats du Foc et des variétés du pois chiche est expliquée à hauteur de 51,4% (Tableau 23).

Tableau 23: Analyse de variance de la variable dépendante : Nombre de ramification

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Variétés	92,062	3	30,687	5,205	0,005
Isolats_FOC	47,063	3	15,688	2,661	0,065
Variétés * Isolats_FOC	60,188	9	6,688	1,134	0,368
Erreur	188,667	32	5,896		
Total	9109,000	48			

a. R deux = ,514 (R deux ajusté = ,286)

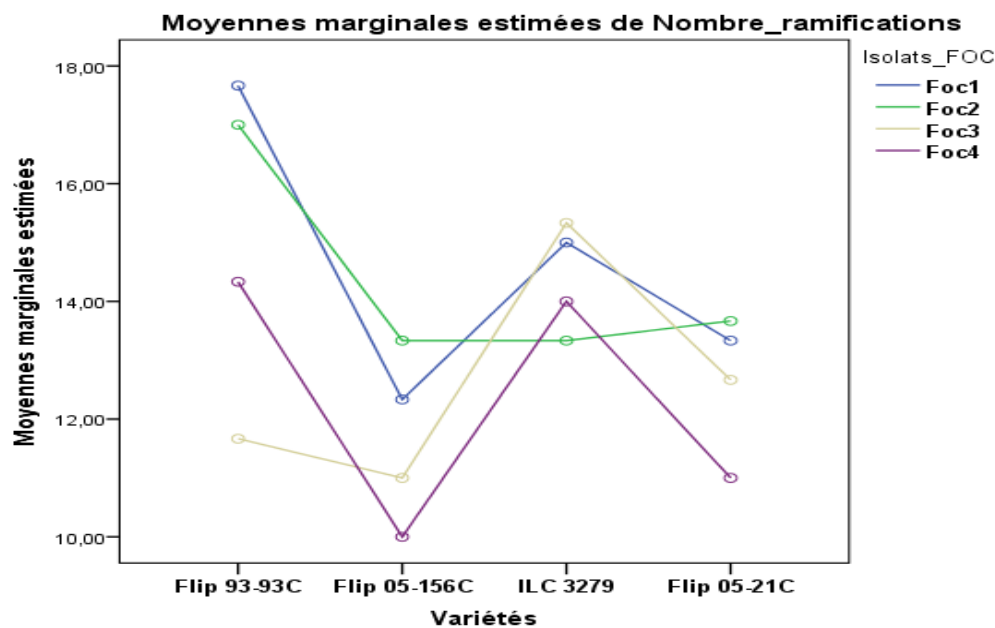


Figure 14: courbes représentant les moyennes de ramification / variété et / isolat du Foc

III.3.1.2. Effet des isolats du *Foc* sur la longueur de tige

Les résultats donnent une moyenne générale de la longueur maximale des tiges égale à 33,86cm. Nous avons enregistré la longueur des tiges la plus faible égale à 19,33cm avec la variété Flip 05-156C lorsqu'elle est infectée avec le Foc4 et la plus importante est obtenue avec la variété Flip 05-21C le l'ordre de 43,5cm lorsqu'elle est infectée par le *Foc2*.

En matière de sensibilité, les résultats donnent la variété Flip 05-156C comme étant la plus sensible aux attaques des différents isolats du Foc avec une moyenne de la longueur des

tiges égale à 27,60cm. En revanche, la variété Flip 93-93C semble être la plus résistante avec une moyenne de 36,69 cm (figure 15).

En matière de virulence, les résultats nous donnent que le Foc 4 est le plus virulent sur les variétés de pois chiche testées où la moyenne des longueurs de tiges était égale à 26,76cm. Par contre le Foc2 semble être le moins virulent avec une moyenne de 38,00 cm (Tableau H, annexe 1 ; figure 14).

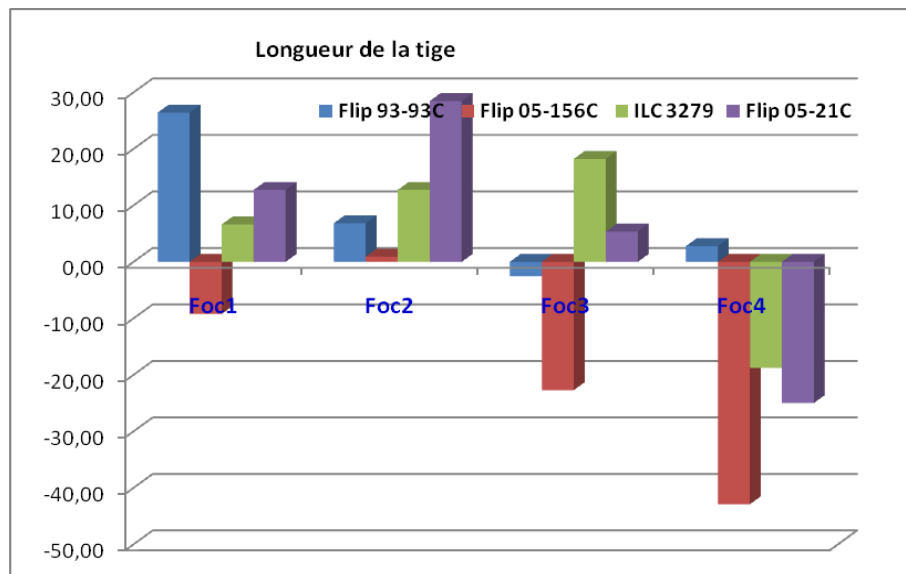


Figure 15: Longueur de tige en fonction des isolats (à gauche) et des variétés (à droite)

Sur le plan statistique, l'analyse de la variance univariée au seuil de 5% a montré un effet variété et un effet isolats du FOC significatifs et en même temps leur interaction (variété x isolat FOC) a été significative (Tableau 24) (figure 16). En plus, la variabilité au sein des isolats du Foc et des variétés du pois chiche est expliquée à hauteur de 77,7% (Tableau 24).

Tableau 24 : Analyse de variance univariée de la variable dépendante : Longueur de la tige

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Variétés	636,702	3	212,234	12,004	0,000
Isolats_FOC	925,702	3	308,567	17,453	0,000
Variétés * Isolats_FOC	403,754	9	44,862	2,537	0,025
Erreur	565,760	32	17,680		
Total	57551,710	48			

a. R deux = ,777 (R deux ajusté = ,672)

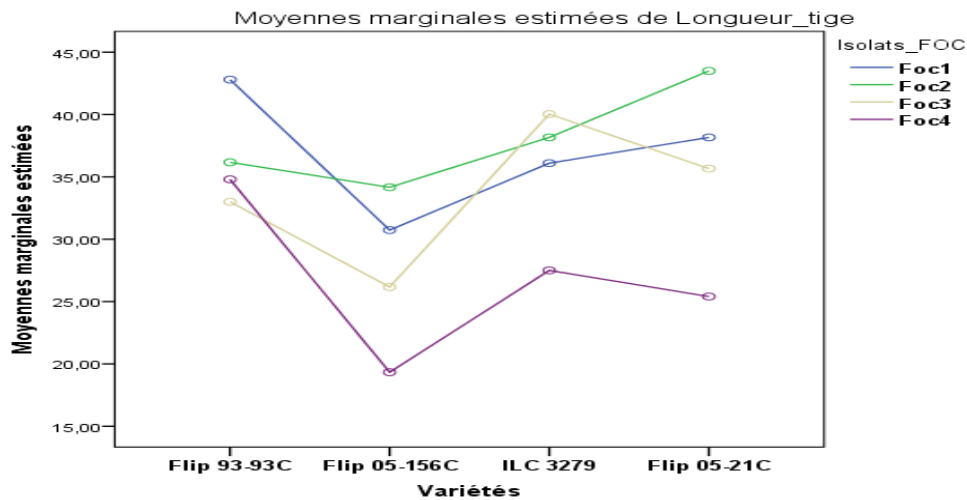


Figure 16: courbes des moyennes de longueur de tige par variété et par isolat du *Foc*

III.3.1.3. Effet des isolats du *Foc* sur la longueur des racines

La mesure de la longueur de la racine principale a donné une moyenne générale égale à 11,54cm. Cette composante de la plante variait entre 7.77cm, la plus faible longueur enregistrée avec la variété Flip 05-156C lorsqu'elle est infectée avec le *Foc4* et un maximum de 15.83cm obtenu avec la variété Flip 05-156C lorsqu'elle est infectée par le *Foc1* (Tableau I, annexe1).

Nous pouvons déduire de ces résultats que la variété ILC 3279 est la plus sensible aux attaques des différents isolats du *Foc* avec une moyenne de 9,47cm. En revanche, la variété Flip 05-21C semble être la plus résistante avec une moyenne de 13,70cm (figure 17). Par ailleurs, en matière de virulence, le *Foc3* semble être le plus virulent sur les variétés de pois chiche testées où la moyenne des longueurs de racines était égale à 9,98cm. Par contre le *Foc2* se présente comme le moins virulent avec une moyenne de 13,06cm.

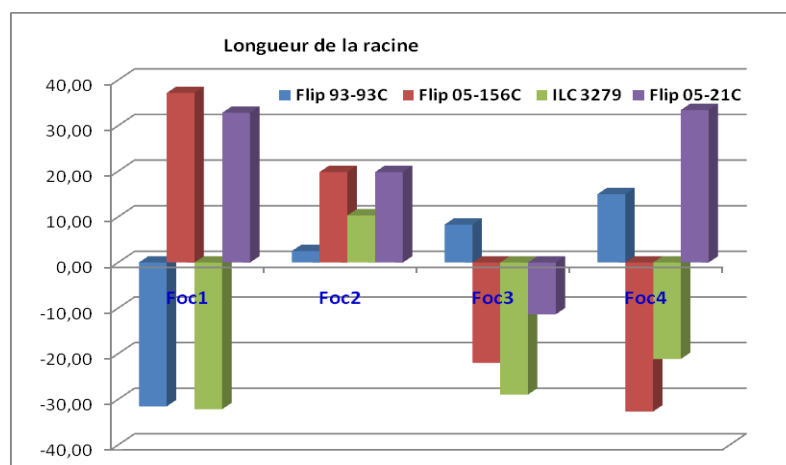


Figure 17: Longueur des racines en fonction des isolats.

Statistiquement, l'analyse de la variance univariée au seuil de 5% n'a montré aucun effet significatif pour les trois sources de variation (variétés, isolats du FOC et interaction des deux, Tableau 25) (figure 18).

Tableau 25: Analyse de variance de la variable dépendante: Longueur de la racine

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Variétés	107,954	3	35,985	1,170	0,336
Isolats_FOC	57,447	3	19,149	0,623	0,605
Variétés * Isolats_FOC	225,044	9	25,005	0,813	0,608
Erreur	983,867	32	30,746		
Total	7763,780	48			

a. R deux = ,284 (R deux ajusté = -,051)

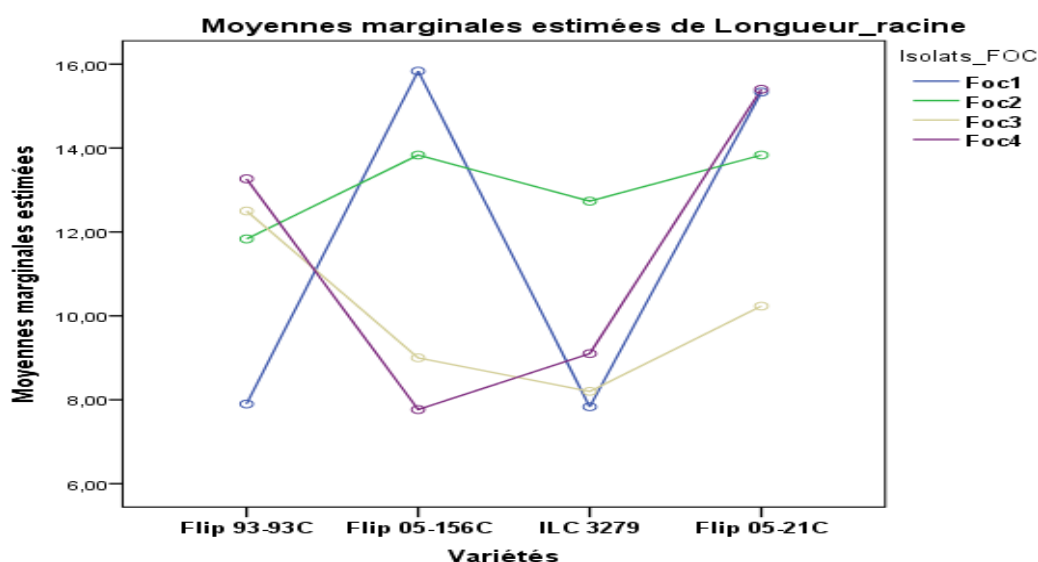


Figure 18: courbes des moyennes de longueur des racines par variété et par isolat du Foc

III.3.1.4. Effet des isolats du *Foc* sur le poids de la partie racinaire

La pesée du poids frais de la partie racinaire nous a donné une moyenne générale égale à 1,15g. Les deux valeurs extrêmes du poids de la partie racinaire sont obtenues avec la variété ILC 3279 variant de 0,46g et 1,68g lorsqu'elle est infectée par le *Foc2* et le *Foc4*, respectivement (Tableau J, annexe 1).

Les résultats nous donnent que la variété Flip 05-156C est la plus sensible aux attaques des différents isolats du *Foc* avec une moyenne du poids de la partie racinaire de l'ordre de 0,96g. En revanche, la variété Flip 93-93C semble être la plus résistante avec une moyenne de 1,41g (figure 19).

En matière de virulence, Les résultats révèlent que le *Foc2* est le plus virulent sur les variétés de pois chiche testées où la moyenne des poids de la partie racinaire était égale à 0.84g alors que le *Foc4* semble être le moins virulent avec une moyenne de 1.37g.

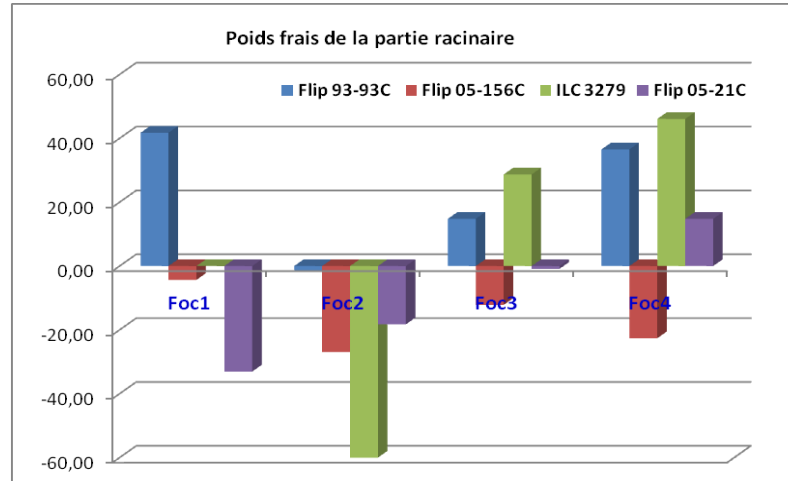


Figure 19: Poids du système racinaire en fonction à gauche isolats et à droite des variétés

Sur le plan statistique, l'analyse de la variance univariée au seuil de 5% a montré un significatif aussi bien individuel avec les variétés et les isolats du FOC que l'interaction variété x isolat FOC (figure 20). La variabilité observée est expliquée à hauteur de 69,9% (Tableau 26).

Tableau 26: Analyse de variance de la variable dépendante: P.F. du système végétatif

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Variétés	2,268	3	0,756	9,439	0,000
Isolats_FOC	1,500	3	0,500	6,242	0,002
Variétés * Isolats_FOC	2,195	9	0,244	3,046	0,010
Erreur	2,563	32	0,080		
Total	40,571	48			

a. R deux = 0,699 (R deux ajusté = ,559)

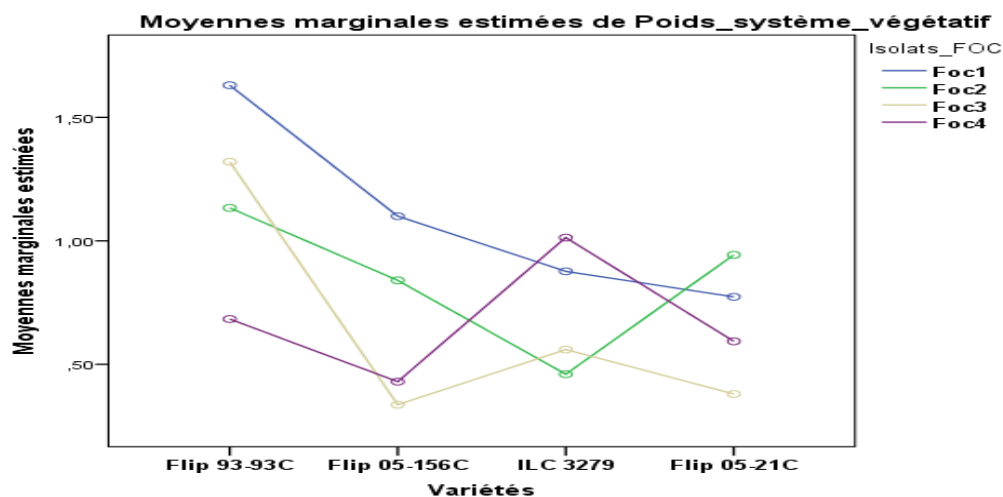


Figure 20: courbes des moyennes du poids des racines par variété et par isolat du Foc

III.3.1.5. Effet des isolats du FOC sur le poids de la partie végétative

La pesée du poids frais de la partie végétative nous a donné une moyenne générale égale à 1,37g. Nous remarquons que le Foc3 a provoqué aussi bien le poids de la partie végétative le plus faible de 0.69g obtenu avec la variété Flip 05-156C et le plus important égal à 1.87g enregistré avec la variété Flip 93-93C (figure 21, Tableau K, annexe 1).

En matière de sensibilité aux infections des isolats des Foc, la variété Flip 05-156C se présente comme la plus sensible avec une moyenne du poids de la partie végétative égale à 1.04g, en revanche, la variété Flip 93-93C semble être la plus résistante avec une moyenne de 1.66g (figure 20). Par ailleurs, les résultats nous donnent que le Foc4 est le plus virulent sur les variétés de pois chiche testées où la moyenne des poids de la partie végétative était égale à 1.20g par contre le Foc2 semble être le moins virulent avec une moyenne de 1.46g.

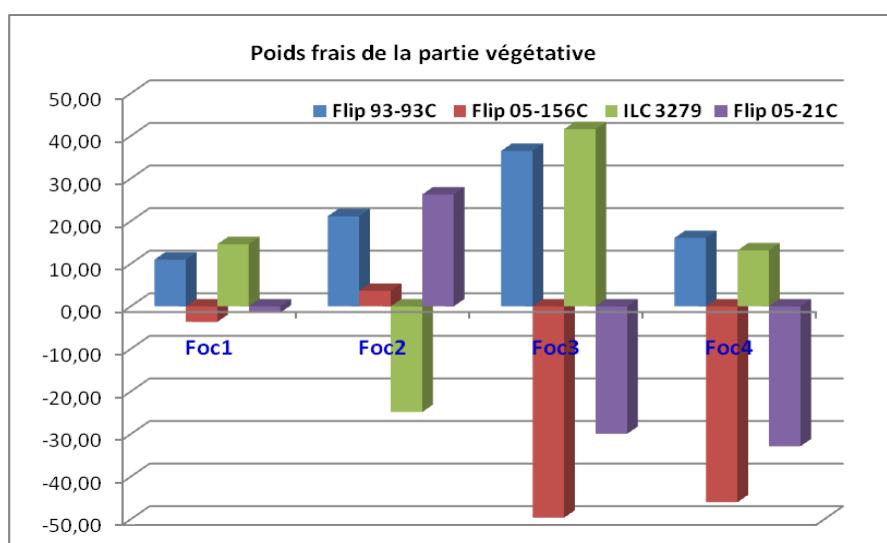


Figure 21: Poids frais du système végétatif en fonction des isolats et des variétés

Sur le plan statistique, l'analyse de la variance au seuil de 5% a montré un effet des effets variété et isolats du Foc significatifs alors que leur interaction était non significatif (figure 22). Donc, la variabilité observée est expliquée à hauteur de 62,8%, et provient essentiellement de la variabilité des variétés et des isolats du Foc (Tableau 27).

Tableau 27: Analyse de variance de la variable dépendante: P.F. frais du système racinaire

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Variétés	2,533	3	0,844	4,741	0,008
Isolats_FOC	3,815	3	1,272	7,140	0,001
Variétés * Isolats_FOC	3,254	9	0,362	2,030	0,068
Erreur	5,699	32	0,178		
Total	80,168	48			

a. R deux = ,628 (R deux ajusté = ,453)

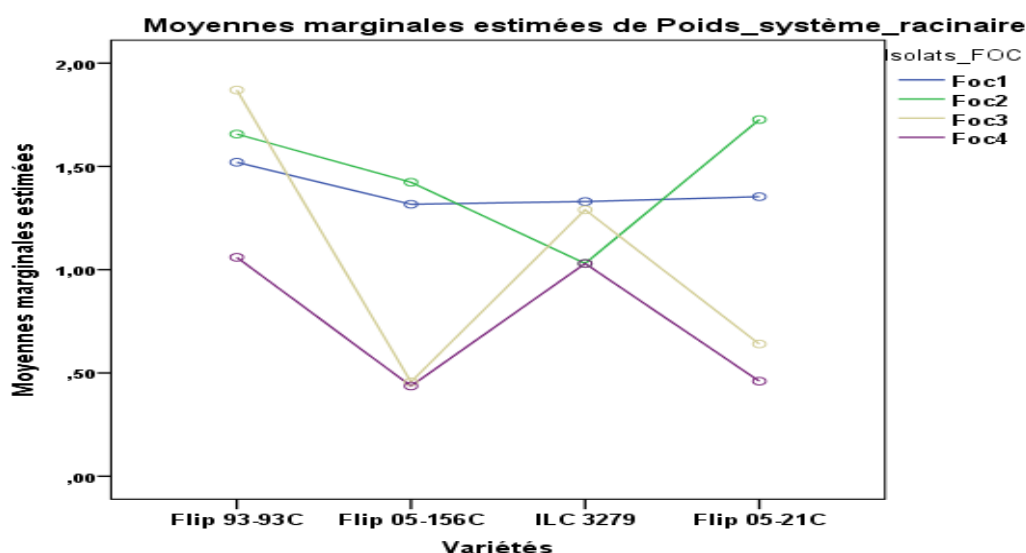


Figure 22: courbes des moyennes du poids du système végétatif / variété et / isolat du Foc

III.3.1.6. Symptômes observés et sélection des variétés et des isolats

L'objectif de l'étude de la pathogénicité est d'arriver à classer les variétés testées en fonction de leur sensibilité envers les attaques du Foc et puis de sélectionner la variété la plus sensible qui sera utilisée ultérieurement dans les tests de biocontrôle.

Les premiers symptômes sont apparus après deux semaines de l'injection sous forme de striure brune des tissus internes visibles. Après, nous avons remarqué l'apparition de jaunissement des feuilles basses, suivi par la nécrose du collet. Justement les plants présentant ce symptôme deviennent fanés et flétris, se dessèchent par la suite et la mortalité s'ensuit.

Nous avons relevé aussi, des jaunissements latéraux, ne touchant qu'une seule ramification, comme il peut être total et généralisé. D'autres plants ont laissé apparaître, un flétrissement rapide des feuilles conjugué avec une couleur vert terne du feuillage de la plante entière (Figure 23).

A la lumière des résultats obtenus lors de la mesure des paramètres de croissance des plants (nombre de ramifications, longueur de la tige principale, longueur de la racine principale, poids frais du système racinaire et poids frais du système végétatif). La stratification des résultats obtenus à travers le test de pathogénicité, nous fait ressortir que la variété Flip 05-156C est la plus sensible comparativement aux trois autres variétés de pois chiche testées. Les variétés Flip 93-93C et ILC 3279, se présentent comme des variétés très proches, sur tous les plans étudiés. Vu que la littérature, affirme que l'ILC 3279, est une variété résistante au Foc, nous avons préféré retenir les variétés Flip 05-156C et Flip 93-93C pour les tests d'antagonisme antifongique et l'étude de l'effet PGPR. Elles seront confrontées aux isolats du Foc2 et Foc1, qui ont réduit d'une manière très nette l'ensemble des variables de croissance mesurées des variétés testées.

III.3.1.7. Discussion sur la pathogénicité des isolats

Le flétrissement vasculaire du pois chiche est une maladie causée par le *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*. Elle est considérée comme l'un des principaux facteurs limitant la production et le rendement de cette sole, en Algérie.

Les résultats de pathogénicité ont révélé que les quatre isolats étudiés, ont induits des symptômes typiques du Foc sur les variétés de pois chiche testées. Ceci nous laisse supposer que les quatre isolats appartiennent potentiellement au *Fusarium oxysporum f.sp.ciceris*.

Le flétrissement, la striure interne des tissus ont pu être observé sur certaines variétés 15 jours suivant le semis dans les pots de cultures. D'autres symptômes associés à la fusariose du pois chiche ont été observés, le cas du jaunissement latéral des ramifications qui peut se généraliser par la suite, les racines des plantes sont aussi attaquées en laissant apparaître des nécroses au niveau du collet ou au niveau du tout le système racinaire, à la suite la plante entière montre la chute des feuilles et une couleur plus pâle que les plantes saines. La plante s'effondre enfin et meurt. Partout dans le monde, les pertes annuelles de rendement de pois chiche en raison de la fusariose varient de 10% à 15% (Trapero-Casas *et al.*, 1985), mais peuvent atteindre même 100% dans certaines conditions (Jiménez-Gasco *et al.*, 2003).

Huit classes de *F. oxysporum f. sp. ciceris* (FOC) sont maintenant identifiées: 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 et 6 (Jimenez-Gasco et Jimenez-Diaz, 2003). Les classes 0, 1A, 1B / C, 5 et 6

ont été signalées en Espagne et en Californie, États-Unis, tandis que les races 2, 3 et 4 en Inde, ces trois dernières classes étant les plus virulents (Haware et Nene, 1982; Jimenez-Diaz et Alcala-Jimenez, 1994; Halila et Strange, 1996).

La variabilité morphologique du FOC est élevée et ne dépend pas de la région géographique des champs de culture ou les propriétés physiques et chimiques du sol (Arvayo-Ortiz et al., 2011). La race 0 est moins virulente et la race 1B/C induit un jaunissement progressif des feuilles par rapport à un flétrissement sévère des souches du aux souches 1A à 6. Il a été également observé que les races 0 et 1 B/C sont pathogènes du cultivar JG-62, tandis que les races 1B/C et 1A, sont modérément ou fortement virulents sur le cultivar C104 (Jimenez-Gasco et al., 2004). Le type de jaunissement du FOC est moins virulent que le flétrissement, mais peut également avoir des différences de virulence entre les souches du même type de comportement (Jimenez-Gasco *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2010).

Dans notre étude l'isolat dénommé Foc2 s'est montré le plus virulent envers les quatre variétés testées et a induit de multitudes de symptômes allant du jaunissement en passant par le flétrissement et arrivant à la mort des plants. Trapero-Casas (1983) a observé qu'après 40 jours, toutes les plantes ont montré des symptômes dans toutes les combinaisons isolées de cultivars, à l'exception du WR-315. Navas-Cortes et al. (2000) ont observé que les races de Foc diffèrent dans l'origine de l'agent pathogène et de la virulence, en fonction de la sensibilité du cultivar. D'autres facteurs favorisant le développement du Foc sont la haute température, l'humidité et la quantité d'inoculum dans sol (Maya, 2002).

Dans cette étude, les plants ont été maintenus à une température variant de 18 et 22°C, tandis que la quantité des inocula initiaux était la même pour les tous les isolats. Ainsi, on suppose que les dégâts dans les plantes peuvent être dus à la sensibilité des variétés aux différentes races du FOC. Sharma et al. (2005) ont étudié la résistance génétique de WR-315 contre les classes 1A, 2, 3, 4 et 5 de FOC et a suggéré que la résistance est monogénique. Alors que d'autres auteurs ont conclu que la résistance à la flétrissure est polygénique et peut avoir des gènes avec des effets secondaires qui modifient la réponse à la maladie. Le comportement de R0 et R5 du Foc dans des lignées de pois chiches n'était pas très différent de ce qui était attendu, du fait que le R0 cause également le flétrissement dans certaines lignées JG-62 (L6) et le jaunissement dans d'autres. Des résultats similaires ont été observés par Tekeoglu *et al.* (2000) et Kaiser *et al.* (1994) avec R0 qui provoque le flétrissement au lieu de jaunissement des feuilles.

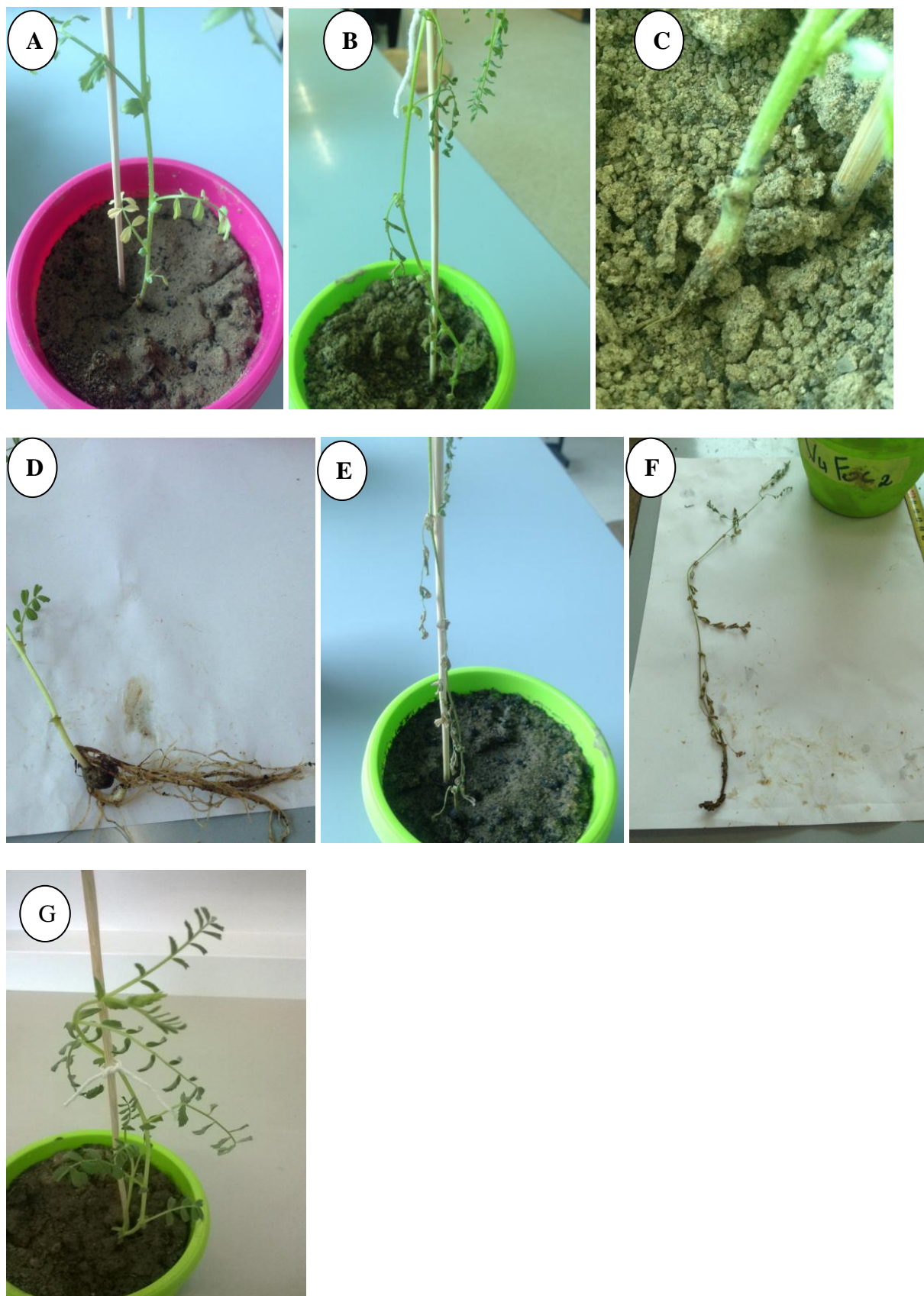


Figure 23: Symptômes observés sur les variétés testées induits par les isolats du Foc. **A:** Jaunissement latéral de ramification **B:** Flétrissement **C:** Nécrose du collet **D:** Nécrose du système racinaire **E:** Dessèchement total **F:** mort du plant **G :** Témoin.

III.3.2. Etude du biocontrôle de la fusariose par les rhizobactéries

III.3.2.1. Effet antagoniste des rhizobactéries sur le nombre de ramification

Le calcul du nombre moyen de ramification lors de l'infection avec le Foc1 a été égal à 10,54 alors qu'il est égal à 9 avec le Foc2. Ceci montre un léger avantage de protection anti Foc1 (figure 24).

La souche bactérienne codée P70 (126, *P.fluorescens*) se présente comme la meilleure bactérie avec une moyenne de 13 ramifications lorsque les plants sont infectés par le *Foc1*, alors que les souches codées B63 (*B.cereus*,) et P66 (25KB, *P.fluorescens*) ont produits 12 ramifications en égalité lorsque la variété est infectée par le *Foc 2*.

On doit signaler que 5 combinaisons bactérie – Foc2 n'ont pas germé, la charge d'inoculum utilisé s'est avérée trop importante et le champignon s'est attaqué aux semences de pois chiche avant la levée des plants ; dénotant un pouvoir pathogène trop important du Foc 2 comparativement au Foc 1.

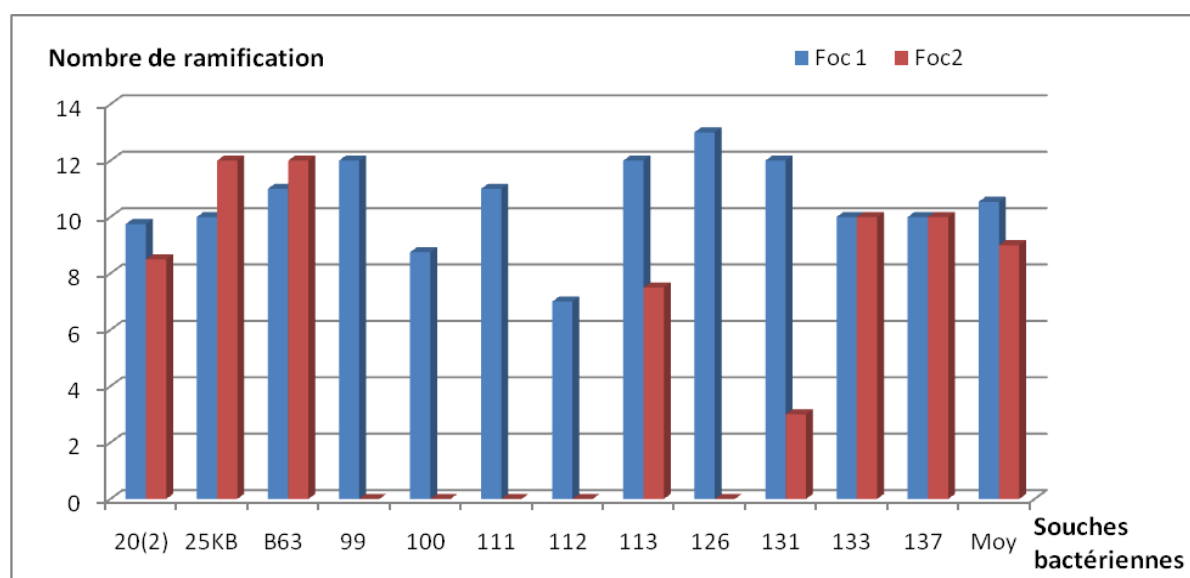


Figure 24: Moyennes du nombre de ramification en fonction des bactéries et des Focs, 20 (2), (B73); 25 KB (P66); B63; 99 (P65); 100 (P53); 111 (B39); 112 (B40); 113 (B41); 126 (P70); 131 (B59); 133 (B61) et 137 (B65).

Sur le plan statistique, l'analyse de la variance au seuil de 5% sur le nombre de ramification a résulté non significative pour les trois effets étudiés à savoir, l'effet isolats du Foc, l'effet souches bactériennes et l'interaction des deux : isolats du Foc x souches bactériennes (Tableau 28).

Tableau 28: Analyse de variance de la variable dépendante: nombre de ramification

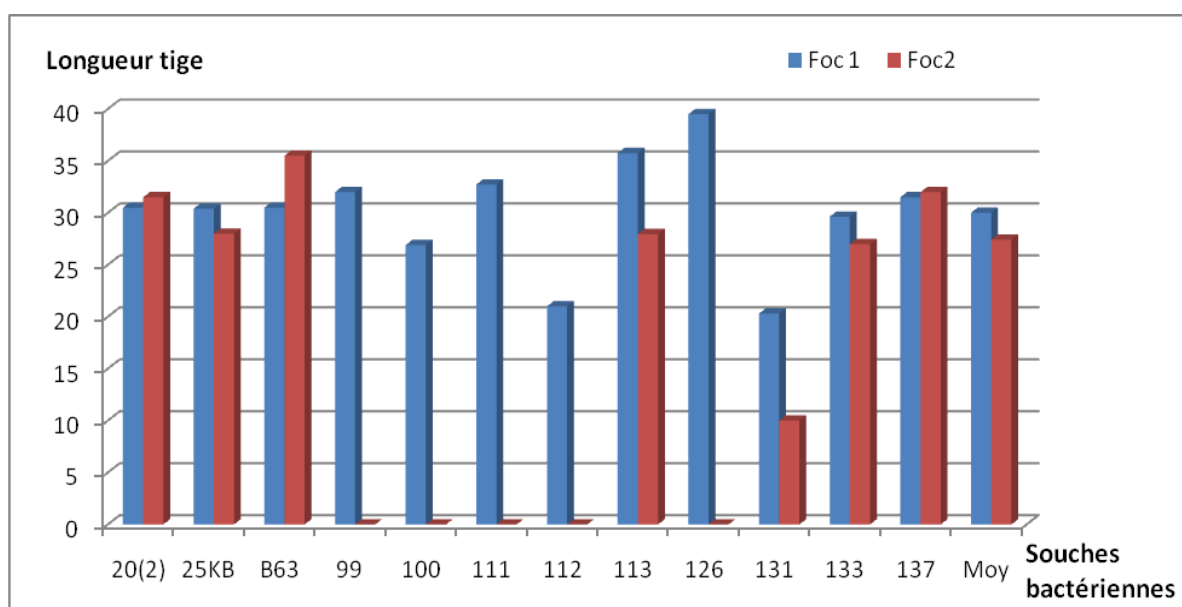
Source	Somme des carrés de type III	Ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
isolats_Foc	17.178	2	8.589	2.011	0.166
Bactérie	62.339	11	5.667	1.327	0.295
isolats_Foc * Bactérie	51.749	6	8.625	2.019	0.122
Total	4235.000	38			

a. R deux = .730 (R deux ajusté = .375)

III.3. 2.2. Effet antagoniste des rhizobactéries sur la longueur de la tige

La mesure de la moyenne de longueur de la tige principale lors de l'infection avec le Foc1 a été égale à 30,02cm alors qu'elle est égale à 27,42cm avec le Foc2. Ceci montre un meilleur effet protecteur contre le Foc1 comparativement au Foc2.

La souche bactérienne P70 (*P. fluorescens*) se présente comme la meilleure souche avec une moyenne de 39,5cm dans le cas où les plants sont infectés par le *Foc1* alors que la souche B63 (*B. cereus*) a produit des tiges d'une longueur moyenne de 35,5cm lorsque les plants sont infectés par le *Foc2* (figure 25).

**Figure 25:** Moyennes de la longueur de la tige en fonction des rhizobactéries et des Focs

Sur le plan statistique, l'analyse de la variance au seuil de 5% a résulté non significative pour les trois effets étudiés à savoir, l'effet isolats du Foc, l'effet souches bactériennes et l'interaction des deux : isolats du Foc x souches bactériennes (Tableau 29).

Tableau 29: Analyse de variance de la variable dépendante: longueur de la tige.

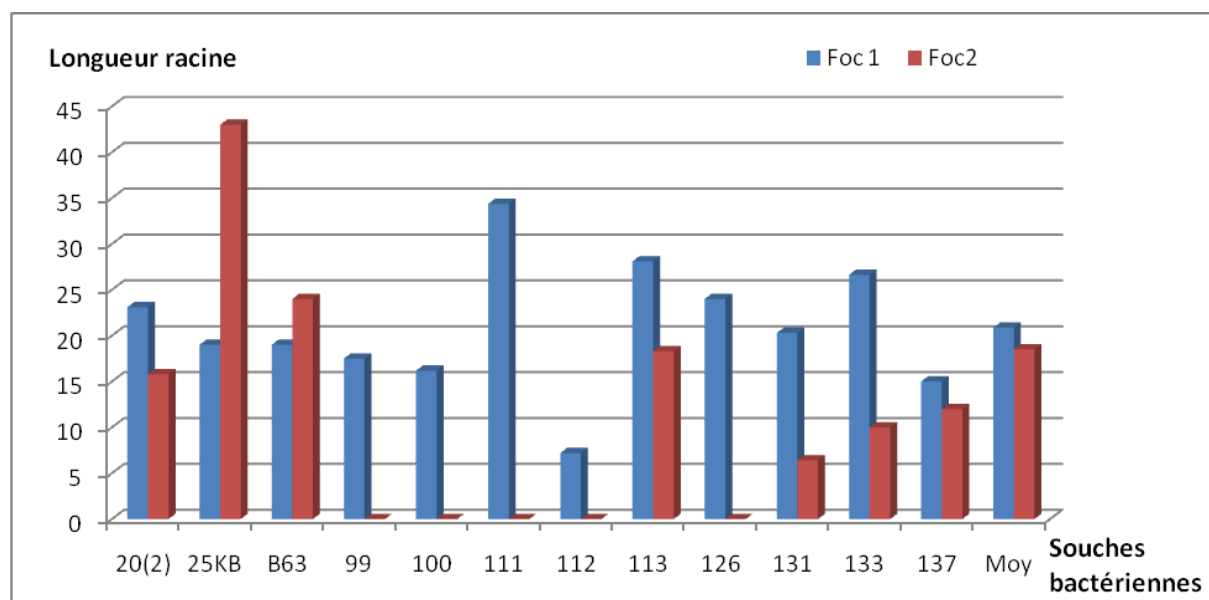
Source	Somme des carrés de type III	Ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
isolats_Foc	85.248	2	42.624	.849	.446
Bactérie	482.029	11	43.821	.873	.581
isolats_Foc * Bactérie	356.824	6	59.471	1.185	.363
Erreur	803.238	16	50.202		
Total	36918.860	38			

a. R deux = .582 (R deux ajusté = .034)

III.3. 2.3. Effet antagoniste des rhizobactéries sur la longueur de la racine

La mesure de la moyenne de la longueur de la racine principale lors de l'infection avec le Foc1 a été égale à 20,87cm alors qu'elle est égale à 18,50cm avec le Foc2. Comme précédemment, le Foc1 est mieux protégé par les souches bactériennes.

Sur le plan individuel, la souche bactérienne codée B39 (*B. firmus*) se présente comme la meilleure souche avec une moyenne de 34,37cm dans le cas où les plants sont infectés par le *Foc1* alors que la souche codée B41 (*B. lentus*) a produit des racines principales d'une longueur moyenne de 18,3cm lorsque la variété est infectée par le *Foc 2* (figure 26).

**Figure 26:** Moyennes de la longueur de la racine en fonction des bactéries et des Focs

Sur le plan statistique, l'analyse de la variance au seuil de 5% sur la longueur de la racine principale a résulté non significative pour les trois effets étudiés à savoir, l'effet isolats du Foc, l'effet souches bactériennes et l'interaction des deux : isolats du Foc x souches bactériennes (Tableau 30).

Tableau 30: Analyse de variance de la variable dépendante: longueur de la racine.

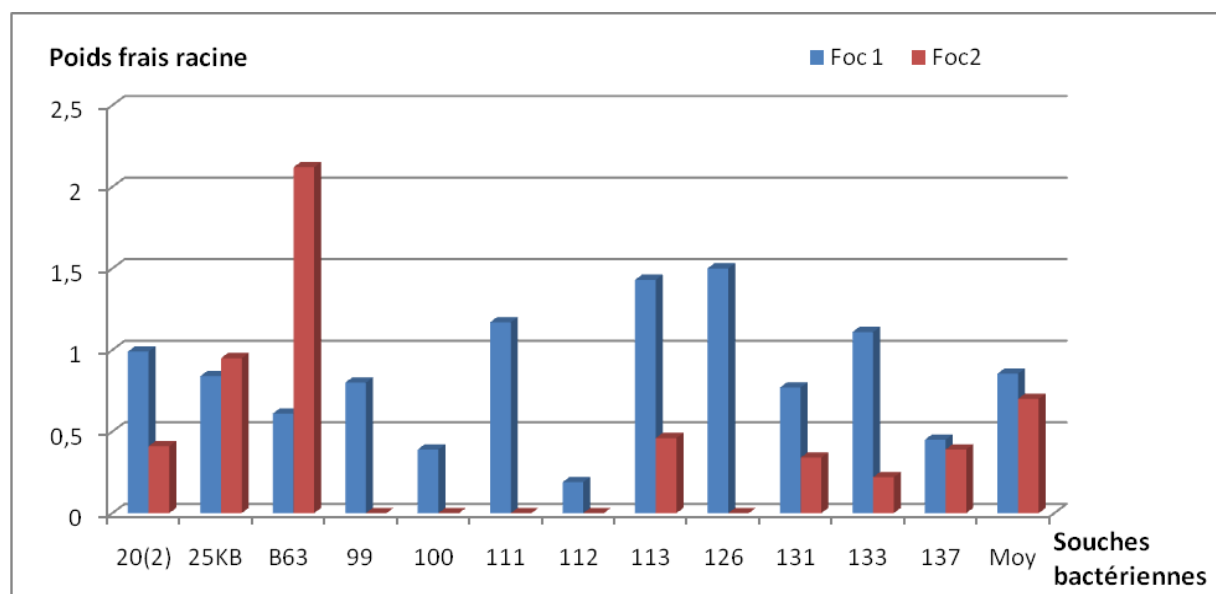
Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
isolats_Foc	40.583	2	20.291	0.095	0.910
Bactérie	1337.333	11	121.576	0.572	0.822
isolats_Foc * Bactérie	646.253	6	107.709	0.506	0.794
Erreur	2977.186	14	212.656		
Total	20571.350	36			

a. R deux = .435 (R deux ajusté = -.411)

III.3. 2.4. Effet antagoniste des rhizobactéries sur le poids frais du système racinaire

La pesée du poids frais moyen du système racinaire lors de l'infection avec le Foc1 a été égale à 0,85g alors qu'elle est égale à 0,70g avec le Foc2. Une différence de protection de taille au profit du Foc1 par rapport au Foc2, qui a pris le dessus sur les rhizobactéries testées.

La souche bactérienne codée B41 (*B. lentus*) se présente comme la meilleure souche avec une moyenne de 1,43g dans le cas où les plants sont infectés par le *Foc1* alors que la souche codée P66 (*P. fluorescens*) a produit un système racinaire d'un poids moyen de 0,95g lorsque la variété est infectée par le *Foc2* (figure 27).

**Figure 27 :** Moyennes du poids du système racinaire en fonction des bactéries et des Focs

L'analyse de la variance au seuil de 5% montr un effet significatif des isolats du Foc sur le poids du système racinaire et un effet non significatif pour l'effet souches bactériennes et l'interaction des deux : isolats du Foc x souches bactériennes (Tableau 31).

Tableau 31: Analyse de variance de la variable dépendante: P.F. frais du système racinaire

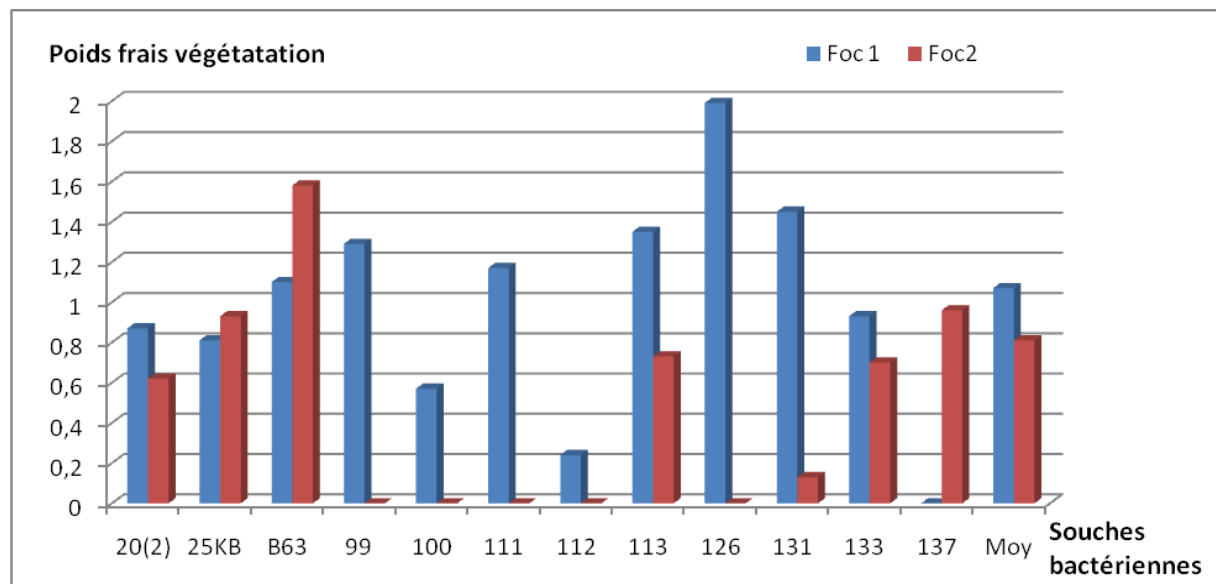
Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
isolats_Foc	43.026	2	21.513	77.190	0.000
Bactérie	2.786	11	0.253	0.909	0.556
isolats_Foc * Bactérie	2.394	6	0.399	1.432	0.271
Erreur	3.902	14	0.279		
Total	134.759	36			

a. R deux = .958 (R deux ajusté = .895)

III.3. 2.5. Effet antagoniste des rhizobactéries sur le poids frais du système végétatif

La pesée du poids frais moyen du système végétatif lors de l'infection avec le Foc1 a été égale à 1,07g alors qu'elle est égale à 0,81g avec le Foc2. Egalement pour ce paramètre, les rhizobactéries testées protègent mieux la variété utilisée contre le Foc1 (figure 28).

La souche P70 (*P. fluorescens*) se présente comme la meilleure souche avec une moyenne de 1,99g dans le cas où les plants sont infectés par le *Foc1* alors que la bactérie codée B63 (*B. cereus*) a produit un système végétatif de poids moyen égal à 1,58g lorsque la variété est infectée par le *Foc 2*.

**Figure 28:** Moyennes du poids du système végétatif en fonction des bactéries et des Focs

L'analyse de la variance au seuil de 5% montre un effet non significatif pour l'effet des isolats du Foc et des souches bactériennes sur le poids du système végétatif et un effet significatif de leur interaction: isolats du Foc x souches bactériennes (Tableau 32).

Tableau 32: Analyse de variance de la variable dépendante: P.F frais du système végétatif

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
isolats_Foc	0.277	2	0.138	0.924	0.417
Bactérie	2.970	11	0.270	1.801	0.138
isolats_Foc * Bactérie	2.517	6	0.420	2.799	0.047
Erreur	2.398	16	0.150		
Total	40.423	38			

a. R deux = .745 (R deux ajusté = .410)

III.3.3. Etude de l'effet PGPR des rhizobactéries sur les variétés de pois chiche

III.3.3.1. Effet PGPR des souches bactériennes le nombre de ramification

Le calcul du nombre moyen de ramification lors de la bactérisation des semences par les rhizobactéries avec la variété Flip 93-93C a été égal à 11,73 alors qu'il est égal à 12.14 avec la variété Flip 05-156C. Si dans le cas de la variété Flip 93-93C, aucune amélioration n'a été obtenue avec l'utilisation des rhizobactéries comparativement à la moyenne de 12 ramifications enregistrée avec le témoin sans bactérisation. En revanche, une nette amélioration du nombre de ramification a été obtenue par rapport aux 10 ramifications obtenues avec le témoin de la variété Flip 05-156C (figure 29).

Sur le plan individuel, les souches bactériennes codées P70 (*P. fluorescens*) et B59 (*B. licheniformis*) se présentent comme les meilleures souches avec une moyenne de 13,5 ramifications lorsque les plants de la variété Flip 93-93C et la variété Flip 05-156C, sont bactérisées, respectivement.

Sur le plan statistique, l'analyse de la variance au seuil de 5% de l'effet des PGPR sur le nombre de ramification n'a montré aucun effet significatif pour les variétés, les souches bactériennes et aussi pour l'interaction variété x souches bactérienne (Tableau 33).

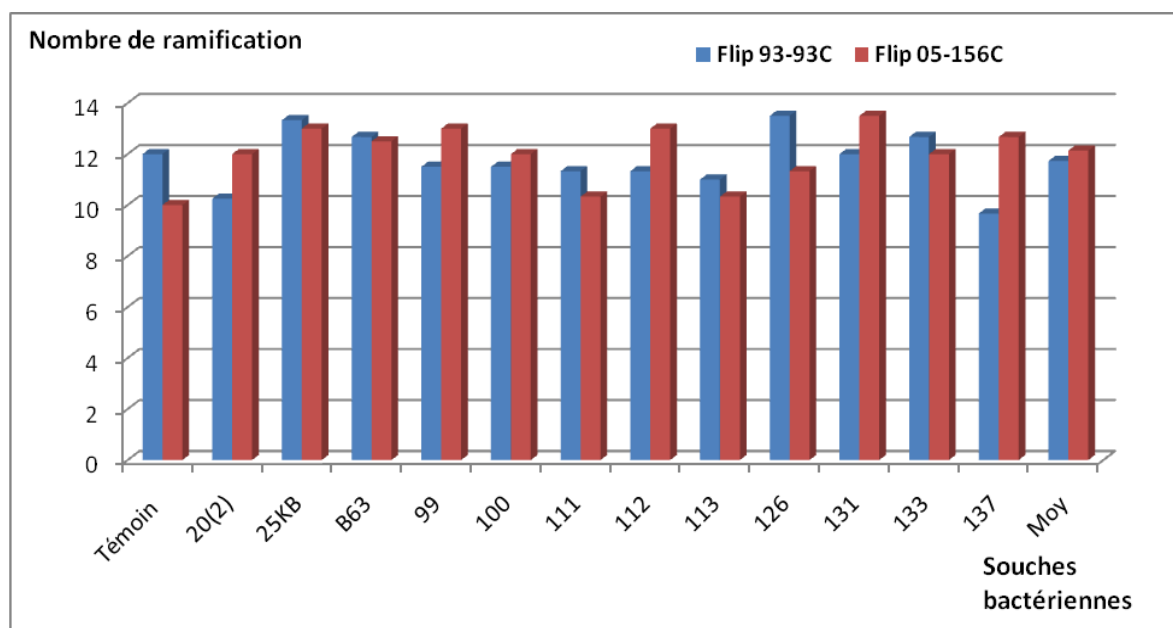


Figure 29: Effet PGPR des rhizobactéries sur le nombre de ramifications des variétés

Tableau 33: ANOVA de l'effet rhizobactéries et variétés sur le nombre de ramification

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Variétés	0.920	1	0.920	0.303	0.585
Bactérie	46.712	12	3.893	1.282	0.258
Variétés * Bactérie	40.731	12	3.394	1.117	0.367
Erreur	154.917	51	3.038		
Total	11096.000	77			

a. R deux = .372 (R deux ajusté = .064)

III.3. 3.2. Effet PGPR des souches bactériennes sur la longueur de la tige

La mesure de la longueur de la tige principale lors de la bactérisation des semences de la variété Flip 93-93C par les rhizobactéries a été égale à 24.99cm alors qu'elle est égale à 33.43cm avec la variété Flip 05-156C. Si dans le cas de la variété Flip 93-93C, aucune amélioration n'a été obtenue avec l'utilisation des rhizobactéries, la moyenne de la longueur de la tige est réduite comparativement au 35cm de longueur enregistrée avec le témoin sans bactérisation. En revanche, avec la variété Flip 05-156C une nette amélioration de la longueur de la tige a été obtenue par rapport aux 24.4cm obtenues avec le témoin (figure 30).

Sur le plan individuel, la souche bactérienne codée P70 (*P.fluorescens*) s'est montrée la meilleure souche ayant améliorée la longueur de la variété Flip 93-93C avec 30,25cm alors

que dans le cas la variété Flip 05-156C ; c'est la souche P65 (*P. luteola*) qui a donné le meilleur score avec 40,20cm.

L'analyse de la variance au seuil de 5% a montré un effet significatif pour les trois sources de variation à savoir variété, souches bactériennes et interaction variété x souche (Tableau 34).

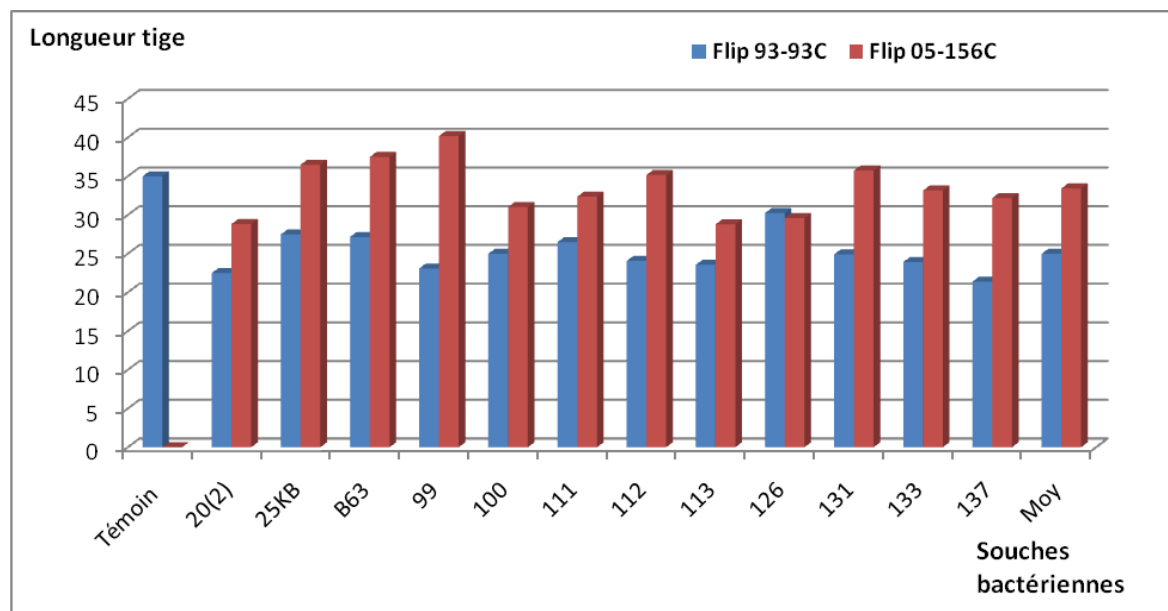


Figure 30 : Effet PGPR des rhizobactéries sur la longueur de la tige des variétés

Tableau 34: ANOVA de l'effet rhizobactéries et variétés sur la longueur de tige

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Variétés	1245.840	1	1245.840	50.659	0.000
Bactérie	588.842	12	49.070	1.995	0.044
Variétés * Bactérie	601.160	12	50.097	2.037	0.040
Erreur	1254.238	51	24.593		
Total	68146.800	77			

R deux = .673 (R deux ajusté = .513)

III.3. 3.3. Effet PGPR des souches bactériennes sur la longueur de la racine

La mesure de la longueur de la racine principale lors de la bactérisation des semences de la variété Flip 93-93C par les rhizobactéries a été égale à 16.64cm alors qu'elle est égale à 22.05cm avec la variété Flip 05-156C. Si dans le cas de la variété Flip 93-93C, aucune amélioration n'a été obtenue avec l'utilisation des rhizobactéries, pire, la moyenne de la longueur de la tige a été réduite comparativement au 25.75cm de longueur enregistrée avec le témoin sans bactérisation. En revanche, avec la variété Flip 05-156C une nette amélioration

de la longueur de la tige a été obtenue par rapport aux 19.95cm obtenues avec le témoin (figure 31).

Sur le plan individuel, la souche bactérienne codée B41 (*B. lentus*) s'est montrée la meilleure souche ayant améliorée la longueur de la variété Flip 93-93C avec 23.43cm alors que dans le cas la variété Flip 05-156C ; c'est la souche P65 (*P. luteola*) qui a donné le meilleur score avec 37.30cm.

Sur le plan statistique, l'analyse de la variance au seuil de 5% aucun effet significatif n'a été observé avec les trois sources de variation à savoir, variété, souches bactériennes et interaction variété x souches (Tableau 35).

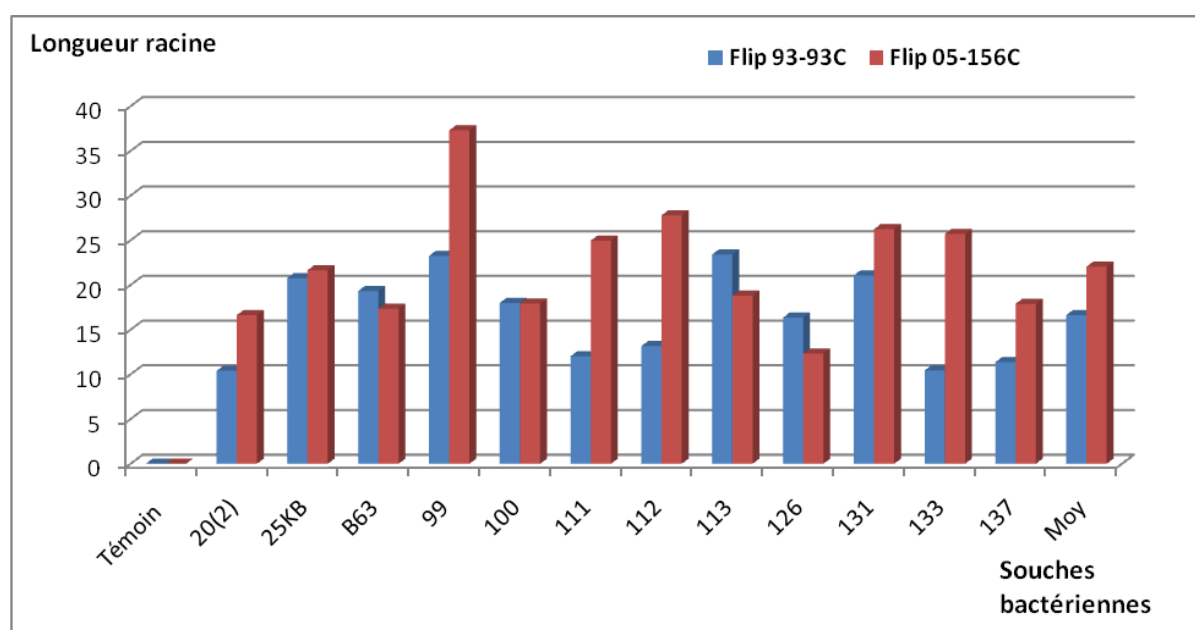


Figure 31 : Effet PGPR des rhizobactéries sur la longueur de la racine des variétés

Tableau 35: ANOVA de l'effet rhizobactéries et variétés sur la longueur de la racine

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Variétés	353.218	1	353.218	3.146	0.082
Bactérie	1308.392	12	109.033	0.971	0.488
Variétés * Bactérie	1032.801	12	86.067	0.766	0.681
Erreur	5726.920	51	112.293		
Total	37731.634	77			

a. R deux = .346 (R deux ajusté = .025)

III.3. 3.4. Effet PGPR des souches bactériennes le poids frais du système racinaire

La pesée du poids frais moyen du système racinaire lors de la bactérisation des semences de la variété Flip 93-93C par les rhizobactéries a été égale à 1.20g alors qu'il est

égal à 1.35g avec la variété Flip 05-156C. Si dans le cas de la variété Flip 93-93C, aucune amélioration n'a été obtenue avec l'utilisation des rhizobactéries, pire, la moyenne du poids moyen du système racinaire a été réduite comparativement au 2.05g enregistrée avec le témoin sans bactérisation. En revanche, avec la variété Flip 05-156C une nette amélioration du poids du système racinaire a été obtenue par rapport aux 0.66g obtenus avec le témoin.

Sur le plan individuel, la souche bactérienne codée P66 (*P. fluorescens*) s'est montrée la meilleure souche dans le cas des deux variétés avec un poids du système racinaire de 1,53g et 2.27g pour la variété Flip 93-93C et la variété Flip 05-156C, respectivement (figure 32).

Sur le plan statistique, l'analyse de la variance au seuil de 5% a montré un effet significatif pour les souches bactériennes et l'interaction variété x souches alors que les variétés non pas donné un effet significatif (Tableau 36).

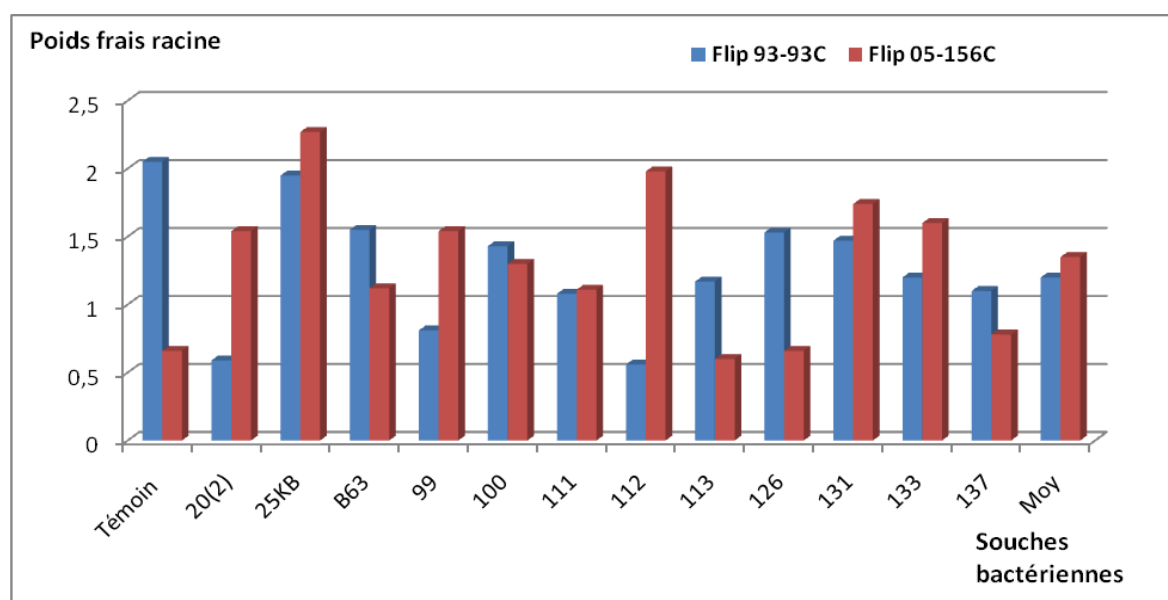


Figure 32 : Effet PGPR des rhizobactéries sur le poids frais du système racinaire

Tableau 36: ANOVA de l'effet rhizobactéries et variétés sur le P. F. du système racinaire

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Variétés	4.569	1	4.569	1.937	0.170
Bactérie	68.481	12	5.707	2.420	0.014
Variétés * Bactérie	71.927	12	5.994	2.541	0.010
Erreur	120.290	51	2.359		
Total	394.428	77			

a. R deux = .485 (R deux ajusté = .232)

III.3. 3.5. Effet PGPR des souches bactériennes le poids frais du système végétatif

Le poids frais moyen du système végétatif lors de la bactériation des semences de la variété Flip 93-93C par les rhizobactéries a été égale à 1.30g alors qu'il est égal à 1.40g avec la variété Flip 05-156C. Si dans le cas de la variété Flip 93-93C, aucune amélioration n'a été obtenue avec l'utilisation des rhizobactéries, pire, la moyenne du poids moyen du système racinaire a été réduite comparativement au 2.13g enregistrée avec le témoin sans bactériation. En revanche, avec la variété Flip 05-156C une nette amélioration du poids du système racinaire a été obtenue si on la compare avec 0.94g obtenu avec le témoin.

Sur le plan individuel, la souche bactérienne codée P66 (*P. fluorescens*) s'est montrée la meilleure souche ayant améliorée le poids du système racinaire de la variété Flip 93-93C avec 2.15g alors que dans le cas la variété Flip 05-156C ; c'est la souche B40 (*B. amyloliquefaciens*) qui a donné le meilleur score avec 2.17g (figure 33).

Sur le plan statistique, l'analyse de la variance univariée au seuil de 5% n'a montré aucun effet significatif pour les trois sources de variations étudiées à savoir, effet variété, effet souches bactériennes et effet interaction variété x souches (Tableau 37).

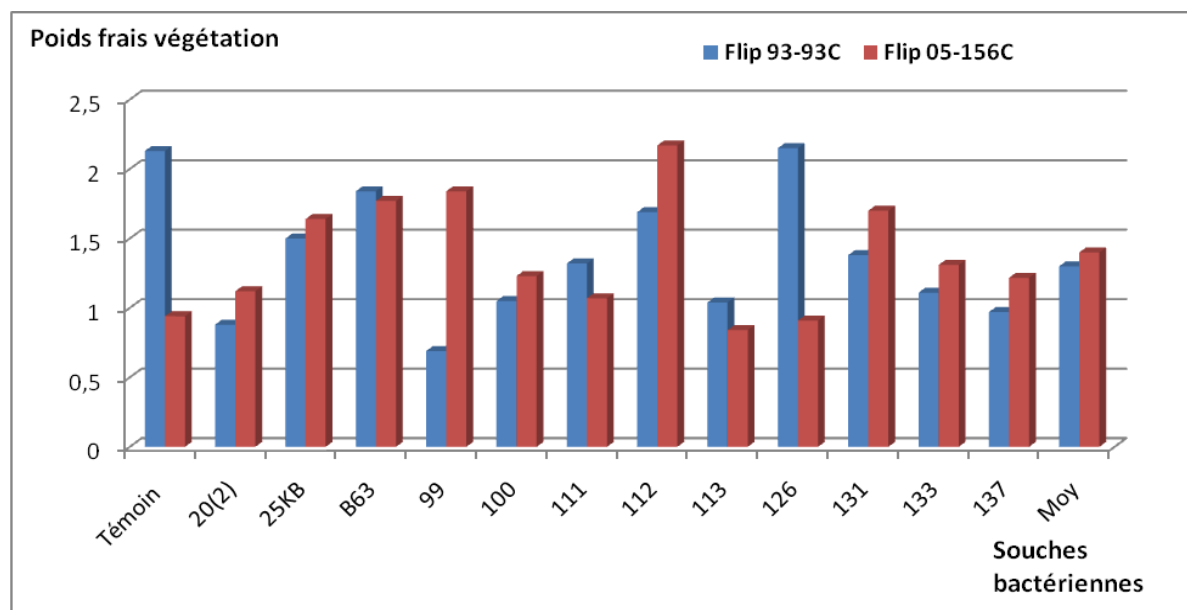


Figure 33 : Effet PGPR des rhizobactéries sur le poids frais du système végétatif

Tableau 37: ANOVA de l'effet rhizobactéries et variétés sur le P. F. du système végétatif

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Variétés	4.324E-5	1	4.324E-5	0.000	0.991
Bactérie	7.043	12	0.587	1.941	0.051
Variétés * Bactérie	5.806	12	0.484	1.600	0.121
Erreur	15.425	51	0.302		
Total	171.052	77			

a. R deux = .452 (R deux ajusté = .184)

III.4. Discussion biocontrôle par les rhizobactéries

Le *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* est économiquement une maladie significative sur le pois chiche. En raison de la nature tellurique de la maladie et l'utilisation des méthodes chimiques pour son contrôle, qui est rarement couronnée de succès. L'incohérence dans le biocontrôle des agents pathogènes transmis par le sol sous différentes conditions environnementales est très limitée. La présente partie de l'étude a été menée pour évaluer l'efficacité de plusieurs souches de *Pseudomonas* et *Bacillus* contre le Foc *in planta*.

Nous avons observé que les souches bactériennes de *Pseudomonas* et *Bacillus* réagissent d'une manière différente avec les isolats du Foc et également en interaction avec les variétés du pois chiche. Globalement, les souches de *Pseudomonas* sont efficaces dans l'antagonisme et les souches de *Bacillus* le sont dans les effets PGPR. En matière d'antagonisme, l'efficacité antifongique des *Pseudomonas*, a été traduite par une amélioration de l'appareil végétatif des plants de pois chiche, spécialement par les souches de *P. fluorescens*. En revanche, les souches de *Bacillus* ont améliorées les variables souterraines à savoir le poids frais du système racinaire pour *B. aneurinolyticus* et de la longueur de la racine principale pour *B. lentus*.

Une corrélation significative a été observée entre les tests de pathogénicité et la réduction de la maladie de (*in vivo*). Par conséquent, on conclut que des mécanismes complexes ont été impliqués dans le processus de biocontrôle. Les paramètres de croissance tels que le nombre de ramification, la longueur de la tige principale, la longueur de la racine principale, le poids frais du système racinaire et du système végétatif étaient significativement plus élevés par la méthode d'enrobage des semences par rapport au témoin non traité.

Par ailleurs, nous avons également constaté que l'apparence de la maladie diminue avec les deux isolats du Foc testés, suite à une bactérisation des semences par les souches bactériennes. Nos travaux suggèrent que, si l'on compare les plantes infectées les deux isolats

deux Foc1 et Foc2, le système racinaire des plants a été modifié ceci est peut être liée à la réponse de croissance accrue provoquée par les souches de *Bacillus*.

Selon Gardener (2004), diverses populations de bactéries formant des endospores aérobies dans les champs agricoles, contribuent directement et indirectement à la productivité des cultures. Les multiples espèces de *Bacillus* et *Paenibacillus* peuvent promouvoir la santé des cultures de diverses manières. En outre, grâce au travail de Reva et al. (2004), et Demoz et Korsten (2006), nous savons que certains *Bacillus spp.* sont de bons colonisateurs des racines et peuvent protéger efficacement l'infection indépendamment des agents pathogènes du sol. Choudhary et Johri (2009) ont démontré que plusieurs activités des souches de *Bacillus* suppriment les pathogènes ou autrement promouvoir la croissance des plantes. L'amélioration de la santé et la productivité des plantes sont régies par trois mécanismes écologiques différents: (i) l'antagonisme des agents pathogènes, (ii) la nutrition de l'hôte et de la croissance promotion, et (iii) la stimulation de la défense de la plante hôte.

En général, les mécanismes associés au biocontrôle contre les agents phytopathogènes par les rhizobactéries comprennent: la synthèse des antibiotiques (Haas et Defago 2005), la production de métabolites de faible masse moléculaire tels que le cyanure d'hydrogène, avec une activité antifongique (Mafia et al., 2009), la production d'enzymes comprenant la chitinase, b -1-3-glucanase, la protéase et la lipase. Ces enzymes peuvent lyser les cellules fongiques (Chet et Inbar, 1994). La concurrence au niveau de la rhizosphère avec des agents de lutte biologique est potentiellement importante pour le contrôle des maladies des plantes.

III.5. Conclusion

La détermination des races de *F.oxysporum* f. sp. *ciceris* est fondamentale pour orienter l'élaboration de stratégies appropriées pour la gestion des maladies en fonction des différentes régions. Dans cette étude, nous avons caractérisé la pathogénicité de quatre isolats issus de différentes de l'Algérie. Les résultats ont laissés montrer une grande variabilité en matière d'induction des symptômes et de la maladie sur quatre variétés de pois chiche.

En effet, l'isolat Foc2 du *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* s'est montré le plus virulent sur les variétés testées et particulièrement sur la variété Flip Flip 05-156C. Ces résultats seront utiles dans l'élaboration de stratégie intégrée de gestion de la fusariose.

L'utilisation de rhizobactéries contre la fusariose des plantes de pois chiche causée par le *Fusarium oxysporum* f. *ciceris* non seulement réduit l'incidence de la maladie et a diminué le nombre de plants présentant des symptômes de flétrissement, mais aussi a augmenté les paramètres de croissance de la plante.

Certaines souches bactériennes, affiliées aussi bien au *Pseudomonas* que *Bacillus*, ont montré des niveaux d'antagonisme et de protection très intéressants. Elles ont agi comme agents de biocontrôle à travers la colonisation de la rhizosphère et en offrant une première ligne de défense pour les racines contre les attaques par des agents pathogènes. Ainsi, les Isolats du Foc se sont trouvés confronter à l'antagonisme avant l'infection des racines.

L'utilisation de variétés résistantes est la meilleure méthode pour le contrôle de la maladie. Cependant, vu la possibilité d'apparence de nouvelles races du pathogène and le contour de la résistance de la défense e la plante hôte, cette méthode n'est pas suffisante pour arrêter la maladie. Donc, on suggère que l'application de rhizobactéries en combinaison avec les variétés résistantes peut donner des résultats bénéfiques et offrir une protection significative contre le *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, à travers la colonisation des racines du pois chiche.

Cette étude a conduit à la sélection des agents de biocontrôle potentiels contre pois chiches fusariose causée par *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, et a démontré que les isolats locaux de *Bacillus* spp. une utilisation prospective comme agents de lutte biologique pour protéger les plantes de pois chiche. Caractériser agents de biocontrôle efficaces contre les maladies transmises par le sol est important pour la réalisation d'une action réussie dans des conditions environnementales complexes et rhizosphère dynamique.

Chapitre IV

Identification et caractérisation des rhizobactéries antagonistes

Chapitre IV : Identification et caractérisation des rhizobactéries antagonistes

IV.1. Introduction

La rhizosphère est un environnement créé par des interactions entre les exsudats racinaires et les microorganismes (Bell-Perkins et Lynch, 2002). Le terme "rhizosphère" tire son origine du grec "*rhizo*" ou "*rhiza*" signifiant "racine" et "sphère", le champ d'action ou d'influence. La rhizosphère comme le lieu d'activités microbiennes autour des racines des légumineuses. Par la suite, cette définition a été étendue à toutes les plantes. Cette zone d'interaction s'étend de quelques micromètres à plus de 2 mm en dehors de la surface racinaire (Kennedy et de Luna, 2004). De même, la densité des bactéries est plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol distant des racines, il s'agit de l'effet rhizosphère (Whippes, 2001 ; Lugtenberg et Kamilova, 2009).

Certains microorganismes, principalement des bactéries telles *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* et *Streptomyces* spp (Gray et Smith, 2005), sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires. Elles influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance directement et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes. Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria).

Dans ce chapitre nous allons d'une part essayer d'identifier la diversité spécifique des rhizobactéries principalement affiliés aux genres des *Bacillus* et des *Pseudomonas*) et d'autre part, de caractériser les souches douées d'un pouvoir antagoniste à travers plusieurs tests morphologique, physicochimique et biochimique.

IV.2. Matériel et méthodes

IV.2.1. Isolement et purification des rhizobactéries

Au total soixante- deux (72) souches de *Pseudomonas* ont été isolées à partir de la rhizosphère des plantes après avoir subis une secousse douce afin de libérer le sol qui adhère aux racines. En effet, un gramme de sol de chaque échantillon a été homogénéisé avec 10ml d'eau distillée afin de constituer les solutions mères. Par la suite une série de dilutions décimales a été obtenue, elle consiste à prélever 1ml de la solution qui précède et le mélanger avec 9ml d'eau distillée stérile pour constituer la solution qui suit et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-5} . Une fois les dilutions préparées, et en vue d'isoler les bactéries recherchées que contient l'échantillon, 1ml de chaque dilution a été étalé sur des boîtes de pétri de 9mm contenant le milieu King B (King et al, 1954). Les boîtes de Pétri sont alors incubées à $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ pour une durée de 48h dans étuve bactériologique de la marque Memmert.

Les colonies de souches bactériennes pures fluorescentes apparues, sont repiquées dans des tubes contenant le milieu KB additionné de 25% de glycérol et incubées dans les mêmes conditions que précédemment. La conservation se fait à une température de -20°C , avec un repiquage tout les 6 mois pour le renouvellement des souches.

Pour l'isolement des *Bacillus*, le protocole Travers *et al.* (1987) avec une légère modification a été adopté. La méthode consiste à peser 1g de sol de chaque échantillon et l'homogénéiser dans 10 ml d'eau distillée stérile. La solution obtenue est soumise à un traitement thermique à la température de 65°C pendant 30mn et des séries de dilutions décimales ont été préparées comme décrit précédemment, une quantité de 0.1ml de chaque dilution a été étalée sur une boîte de pétri contenant la gélose nutritive. Les boîtes de Pétri sont alors incubées à $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ pour une durée de 48h dans étuve bactériologique Memmert.

Les souches de *Bacillus* purifiées sont identifiées grâce à la réaction de gram et la présence d'endospore. Les tubes sont ensemencés et incubés à la température de 28°C pendant une durée de 24h à l'étuve de marque Memmert. Les tubes qui ont montré une croissance bactérienne on été conservés à 4°C pour une durée de 4 à 6 semaines dans des tubes inclinés contenant le milieu GN (Gélose nutritif), (Marchel et al, 1982).

IV.2.2. Identification des rhizobactéries

IV.2.2.1. Etude des caractères morphologiques

L'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification (Prescott's, 2002).

La caractérisation morphologique des souches a été basée sur des observations macroscopiques afin de définir l'aspect des colonies bactériennes alors que l'observation sous microscope optique (grossissement x100) permet la différenciation des caractères morphologiques : forme des bacilles, type de Gram, coques et disposition des cellules.

IV.2.2.2. Aspect microscopique

On peut observer les bactéries par deux techniques, soit à l'état frais ce qui permet de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries, soit la coloration de Gram et la coloration de spores, qui permet de mettre en évidence les spores et leur position sur les cellules bactériennes). En effet, la coloration de gram a été effectuée où deux gouttes d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH 3%) sont mises en contact avec une crème bactérienne sur une lame en effectuant un mouvement circulaire. La solution KOH devient visqueuse en présence des bactéries à gram négatifs. La réaction est considérée positive si la viscosité est obtenue après 30s (Bourgault et Lamothe, 1988).

IV.2.3. Détermination des types et enzymes respiratoires

C'est un test qui concerne les espèces du genre *Bacillus*. Il permet la différenciation des souches qui poussent en milieu aérobiose et celles qui vivent en anaérobiose.

Le test de culture en aérobiose est réalisé en présence de l'oxygène atmosphérique, lorsqu'on observe une croissance après 24 heures à 30°C, cela signifie que la bactérie est aérobie. Et elle définit bactérie anaérobie si elle arrive à croître après 24 heures à 30°C dans une culture en anaérobiose partielle avec une atmosphère enrichie en CO₂ (Prescott's, 2002).

IV.2.4. Production des enzymes respiratoires terminales

IV.2.4.1. Recherche de l'oxydase

Ce test, standardisé pour l'identification bactériologique (Prescott, 2007). Le test de l'oxydase met en évidence la présence d'une cytochrome-oxydase qui oxyde le cytochrome c réduit. Ce test met en évidence la présence de cytochrome c dans les chaînes respiratoires grâce à des réactifs ayant le même potentiel d'oxydo-réduction que le cytochrome c. L'oxydase a été mise en évidence sur papier filtre selon la technique de Kovacs (1956), où une colonie est étalée sur un disque imprégné de Diméthyl-p-phénylène diamine préalablement trempé dans de l'eau distillée stérile.

La réaction positive se traduit par l'apparition d'une couleur rouge violacée au bout de 10 secondes (s); elle est considérée tardive si elle se développe entre 10 et 60s, dépassée la durée de 60s, elle est considérée négative.

IV.2.4.2. Recherche de la catalase

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée. La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et oxygène. C'est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies et anaérobies facultatives contenant un cytochrome, la catalase décompose le H₂O₂. La mise en évidence de la catalase se pratique par l'ajout d'une goutte de H₂O₂ à volume 10 et Prélever à l'aide de l'effilure d'une pipette pasteur un fragment de colonie et dissocier la culture dans l'eau oxygénée. y dissocier une colonie prélevée à l'aide d'une anse platine. Le dégagement d'O₂ sous forme de bulles de gaz est synonyme que la bactérie a produit de la catalase e ainsi elle est considérée comme catalase positive (Talaro et Talaro, 2002).

IV.2.4.3. Recherche de la gélatinase

La production de la gélatinase est mise en évidence à travers l'ensemencement par piqure centrale de la souche bactérienne dans des tubes à essais contenant la gélatine comme milieu nutritif. Les tubes sont incubés à 30°C pendant une durée de 24 - 48h. L'étape suivante, consiste à placer les tubes de gélatine nutritive dans un réfrigérateur à 4°C pendant 30 minutes ou dans un bain de glace pendant 3 à 5 minutes. Si la gélatine nutritive est présente sous forme liquide, ceci indique que la gélatine a été hydrolysée par la bactérie. En revanche, si aucune hydrolyse ne se produisait, le milieu demeurera un gel (Matter, 2001).

IV.3. Caractérisation et identification des souches de *Pseudomonas*

L'identification préliminaire des espèces de *Pseudomonas* produisant le pigment fluorescent, est essentiellement basée sur les caractéristiques morphologiques (morphologie cellulaire, la coloration de Gram), sur les caractéristiques biochimiques (la recherche de la catalase et de l'oxydase, l'arginine dihydrolase, la voie d'utilisation du glucose, l'hydrolyse de la gélatine, l'hydrolyse d'amidon, la réduction de nitrate, l'arabinose, le sorbitol, la β .galactosidase) et également que quelques caractéristiques physiques (la croissance à 41°C, la croissance à 4°C, Shaad, 1988).

L'identification des espèces de *Pseudomonas* a reposé également sur l'utilisation des galeries API 20 NE qui mettent en évidence d'autres activités biochimiques spécifiques telles

que la formation d'indole, l'uréase, l'assimilation du mannose, le mannitol, le N. acétylglucosamine, le maltose, le Potassium gluconate, l'acide caprique, l'acide adipique, le malate, le trisodium citrate, l'acide phénylacétique (Logan and Berkeley, 1984).

IV.3.1. Production de pigment fluorescent

Les *Pseudomonas fluorescens* se distinguent par la production de pigments jaune-vert fluorescents (pyoverdine ou pseudobactine) dans des conditions de carence en fer. La production du pigment fluorescent a été recherchée sur des boîtes de Pétri contenant le milieu KB. Ainsi après une incubation d'une durée de 24 à 96 heures à la température comprise entre 27 et 28°C, le développement du pigment fluorescent a été révélé à l'œil nu ou sous une lampe UV de marque à une longueur d'onde soit 254nm ou 366nm. (Höfte et Altier, 2010).

IV.3.2. Détermination de la température optimale

La croissance bactérienne à des températures d'incubation de 4°C et 41°C a été utilisée en vue de déterminer *Pseudomonas aeruginosa* des autres *Pseudomonas* car elle est la seule espèce qui pousse à 41°C et non à 4°C (Shaad, 1988).

IV.3.3. Système d'identification microbien

Les galeries Api 20 NE (Biomérieux) est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non enterobactéries et non fastidieux (ex. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.) combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation et une base de données. Chaque galerie comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries se cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

L'identification est obtenue grâce à un catalogue analytique (Bio-Mérieux, 2011) ou à l'aide d'un logiciel d'identification (Joffin, 2008).

IV.3.3.1. Préparation de la galerie

On commence par réunir le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation et on fait répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Cl₂, CO₂ ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère

humide. Ensuite, on inscrit la référence de la souche sur une languette latérale de la boîte ; (on doit faire attention de ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation). Après avoir déballé la galerie de son emballage individuel, on place la galerie dans la boîte d'incubation (Bio-Mérieux, 2011).

IV.3.3.2. Préparation de l'inoculum

Des ampoules d'API NaCl 0,85 % Medium (2ml) livrées avec le kit ont été utilisées. Parallèlement, à l'aide d'une pipette ou d'une pipette de Pasteur, on prélève par aspirations ou par touches successives 1 à 4 colonies de morphologie identique de préférence des cultures jeunes âgées de 18 à 24 heures. Ceci dans le but d'obtenir une suspension d'une opacité égale à 0,5 de McFarland, cette suspension doit être utilisée extemporanément (Bio-Mérieux, 2011).

IV.3.3.3. Inoculation de la galerie

On débute par le remplissage des tubes (et non les cupules) des tests NO_3 à PNPG avec la suspension précédente en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, on pose la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant. Par la suite on ouvre une ampoule d'API et on fait transférer environ 200 μl de la suspension précédente tout en homogénéisant avec la pipette en évitant la formation des bulles.

L'étape suivante consiste à remplir les tubes et les cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects. Ensuite, on fait remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe. L'opération se termine par l'incubation de la boîte à $29^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24 heures (± 2 heures) (Bio-Mérieux, 2011).

IV.3.3.4. Lecture des résultats de la galerie

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture livrée avec le kit. On commence par la notation sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG). La révélation des deux tests NO_3 et TRP doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air ; pour cela, placer le couvercle de la boîte d'incubation au dessus de ces tests, pendant la période de révélation des tests NO_3 et TRP.

IV.3.3.4.1. Mise en évidence NO₃

La mise en évidence de la production du NO₃ se fait en ajoutant une goutte de réactifs NIT 1 et NIT 2 dans la cupule NO₃. Après 5 mn, une couleur rouge indique une réaction positive, qu'on note sur la fiche de résultats. Alors qu'une réaction négative peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) ; on ajoute alors 2.3mg de réactif Zn dans la cupule NO₃. Encore 5 mn, la cupule qui reste incolore indique une réaction positive qu'on note sur la fiche de résultats. Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative car les nitrates encore présents dans le tube ont alors été réduits en nitrites par le zinc. La réaction utilisée pour l'identification de la bactérie est la réduction des nitrates ; elle est positive si l'une ou l'autre des deux réactions précédentes (production de NO₂ ou de N₂) est positive. La production de N₂ peut cependant être utilisée seule comme test complémentaire dans le Catalogue Analytique (Bio-Mérieux, 2011).

IV.3.3.4.2. Mise en évidence du TRP

Elle se fait par l'addition d'une goutte du réactif JAMES. Le développement de la couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive (Bio-Mérieux, 2011).

IV.3.3.4.3. Mise en évidence des tests d'assimilation

Les tests ont pour objectif l'observation de la croissance bactérienne. Une cupule trouble indique une réaction positive. Des croissances d'intensité intermédiaire peuvent être observées et notées —+ ou +— (Bio-Mérieux, 2011).

IV.4. Caractérisation et identification des souches de *Bacillus*

Les tests primaires incluent l'examen microscopique après colorations, en particulier la coloration de Gram, catalase, oxydase, présence de l'hémolyse et la motilité (Buller, 2004). Les différentes espèces de *Bacillus* sont classées en groupe selon leur morphologie cellulaire, en particulier la forme et la localisation de l'endospore (Perry et al., 2004).

Traditionnellement, les *Bacillus* spp. sont identifiés dans le laboratoire par les tests biochimiques. Le système de l'identification s'est avéré plus reproductible que les méthodes classiques et est capable de spécifier des *Bacillus* en utilisant 49 essais dans les bandes d'API 50CHB (Wu et al., 2006). Les tests de production des acides à partir de l'assimilation des substrats de carbone sont de grande valeur dans la caractérisation et l'identification des espèces du genre *Bacillus* (Logan et al., 2002). En outre, les tests phénotypiques suivants ont été réalisés : test de catalase et d'oxydase; croissance en anaérobiose; dégradation d'amidon, de

gélatine, lipides et de caséine, l'utilisation des galeries rapides d'identification API 50CHB (Biomérieux, Berber, et Yenudnya, 2005). Pour identifier les souches de *Bacillus*, l'oxydase, la catalase, l'hydrolyse d'amidon, la croissance anaérobique.

IV.4.1. Système d'identification microbien

Les galeries Api 50 CHB (Biomérieux), est un système standardisé associant 50 tests biochimiques permettant l'étude du métabolisme des carbohydrates des microorganismes. L'API 50 CH est utilisé en combinaison avec l'API 50 CHL Medium pour l'identification des *Lactobacillus* et espèces apparentées et avec l'API 50 CHB/E Medium pour l'identification des *Bacillus* et espèces apparentées, des *Enterobacteriaceae* et *Vibrionaceae*.

Les galeries API 50 CH permettent l'étude de la fermentation des hydrates de carbone et dérivés. Principalement, on trouve des hétérosides, des polyalcools et des acides uroniques.

Les tests de fermentation sont inoculés avec API 50 CHL Medium qui réhydrate les substrats. Durant la période d'incubation, la fermentation se traduit par un changement de couleur, dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi. Le premier tube, sans principe actif, sert de témoin négatif (Bio-Mérieux, 2002).

IV.4.1.1. Préparation de la galerie

Chaque galerie est constituée de 5 bandes comprenant chacune 10 tubes numérotés. On commence par l'inscription de la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. Puis, on répartit environ 10 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex Cl_2 , CO_2 ...)] dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide. Ensuite, on sort les bandes de leur emballage, qu'on sépare en deux bandes 0.19 et 20.39 et on les dépose au fond de la boîte d'incubation tout en les complétant les galeries avec la bande 40.49 (Bio-Mérieux ; 2002).

IV.4.1.2. Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes cultivées sur un milieu adapté à leur croissance doivent être d'une pureté irréprochable pour ne pas fausser les résultats. Les cultures sont récoltées par écouvillonnage d'un milieu solide et inoculées dans le milieu approprié. Ces suspensions doivent être utilisées extemporanément.

IV.4.1.3. Inoculation de la galerie

Chaque souche des suspensions bactériennes est répartie à l'aide d'une pipette stérile dans les 50 tubes de la galerie en se conformant aux précautions du manufacturier (on doit incliner légèrement vers l'avant la boîte d'incubation, on doit éviter la formation de bulles en posant la pointe de la pipette sur le côté de la cupule). Lorsque le tube seul doit être inoculé, on ne pas dépasser la limite supérieure du tube afin de conserver une bonne anaérobiose. Et lorsque le tube et la cupule doivent être complètement remplis, on doit éviter la formation d'un ménisque concave ou convexe. L'opération se termine par l'incubation à 28°C pendant 24h à 48h (Bio-Mérieux ; 2002).

IV.4.1.4. Lecture des résultats de la galerie

Les résultats se résument à l'acidification des tubes qui se traduit par le virage au jaune du rouge de phénol contenu dans le milieu, à l'exception du tube n° 25, représentant le test esculine, on observe un virage du rouge au noir (Bio-Mérieux ; 2002).

IV.5. Effet des conditions physicochimiques du milieu sur la croissance

IV.5.1. Effet du pH sur la croissance bactérienne

L'effet du pH sur la croissance des souches bactériennes a été étudié à travers l'ensemencement de trois tubes contenant du bouillon nutritif ayant un pH variant de 6.0 à 9.0 avec des intervalles d'une seule unité de pH. Après une incubation à la température de 28°C pour une durée de 48 heures. Les résultats de la croissance bactérienne ont été estimés par spectrophotomètre de marque Jenway 7310 à une longueur d'onde de 600nm. (Matter, 2001).

IV.5.2. Effet du NaCl sur la croissance bactérienne

La détermination de l'effet du NaCl sur la croissance des souches bactériennes a été étudiée à travers l'ensemencement à partir d'une culture bactérienne (en bouillon) de trois tubes contenant du bouillon nutritif caractérisé par différente concentration de sel allant de 0, 50, 100, 150, à 200 mM de NaCl. Après une incubation à la température de 28°C pour une durée de 48 heures. Les résultats de la croissance bactérienne ont été estimés par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm (Matter, 2001).

IV.6. Résultats et discussion

IV.6.1. Identification des souches de *Bacillus*

IV.6.1.1 Caractérisation macroscopiques et microscopiques des souches de *Bacillus*

Au total, 80 souches de *Bacillus* ont été isolées par le traitement thermique. La caractérisation macroscopique des colonies isolées sur la gélose nutritive montre des colonies de forme et de taille variables. Certaines colonies sont circulaires, d'autres de forme irrégulière atteignant des dimensions allant de 1 à 6 mm de diamètre. L'aspect des colonies est aussi différent, il peut être visqueux ou sèche, lisse ou granulaire, les colonies sont opaques ou translucides avec des couleurs blanche à crème.

L'observation microscopique permet la visualisation de larges bacilles à toutes Gram positive, diploïdes ou isolés, ou en chaîne. La production des spores et la position au sein de la cellule végétative est un critère fondamental d'identification des espèces de genre *Bacillus*. En effet, nous avons remarqué que les spores avaient des positions qui de l'ellipsoïdale, subterminale, centrale à la position terminale et elle est soit déformante ou non déformante.

D'une manière générale, les caractéristiques relevées, répondent globalement aux caractères généraux du genre *Bacillus* (Tableau 38).

Tableau 38: Caractères morphologiques des souches de *Bacillus* sélectionnées.

Souches <i>Bacillus</i>	Aspect macroscopique						Aspect microscopique		
	Taille	Forme	Opacité	Couleur	Consistance	Conteur	Forme	Gram	Spore
B22	3mm	Circulaire	Opaque	crème	visqueuse	régulier	bacille	+	Ellipsoïdale déformante
B27	5mm	Circulaire	Opaque	crème	visqueuse	irrégulier	bacille	+	Ellipsoïdale déformante
B39	3mm	Circulaire	Opaque	crème	muqueuse	régulier	bacille	+	Subterminale non déformante
B40	3mm	Circulaire	Translucide	crème	Visqueuse	régulier	bacille	+	Ellipsoïdale déformante
B41	3mm	Circulaire	Translucide	crème	Visqueuse	régulier	bacille	+	Centrale non déformante
B45	2mm	Circulaire	Opaque	blanche	Visqueuse	irrégulier	bacille	+	Terminale déformante
B47	1mm	Dentées	Opaque	crème	Visqueuse	irrégulier	bacille	+	Subterminale non déformante
B48	3mm	Circulaire	Opaque	blanche	Visqueuse	irrégulier	bacille	+	Terminale déformante
B53	3mm	circulaire	Translucide	crème	Visqueuse	régulier	bacille	+	Subterminle non déformante
B59	<1mm	circulaire	Opaque	blanche	Visqueuse	irrégulier	bacille	+	Terminale non déformante
B61	1mm	dentées	Opaque	crème	Visqueuse	irrégulier	Bacille	+	Ellipsoïdale subterminale
B62	4mm	irrégulier	Opaque	cotonneux	sèche	irrégulier	bacille	+	Terminale
B63	3mm	irrégulier	Translucide	cotonneux	sèche	irrégulier	bacille	+	Terminale non déformante
B64	6mm	crénelée	Opaque	jaune	Visqueuse	irrégulier	bacille	+	Subterminale non déformante
B65	3mm	circulaire	Opaque	blanche	muqueuse	irrégulier	bacille	+	centrale déformante
B67	4mm	irrégulier	Opaque	cotonneux	sèche	irrégulier	bacille	+	centrale non déformante
B69	2mm	Circulaire	Translucide	Crème	Visqueuse	régulier	bacille	+	Centrale déformante
B72	4mm	Dentée	Opaque	Crème	sèche	irrégulier	bacille	+	centrale déformante
B73	4mm	Dentée	Opaque	Crème	sèche	irrégulier	bacille	+	terminale déformante
B79	3mm	irrégulier	Opaque	Crème	sèche	irrégulier	bacille	+	Terminale déformante

IV.6.1.2. Détermination des types respiration et des enzymes respiratoires

L'ensemble des souches identifiées avait la faculté de produire de l'enzyme oxydase (l'enzyme cytochrome-oxydase qui oxyde le cytochrome c réduit dans la chaîne respiratoire), et également toutes résultaient catalase positives (la catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et oxygène). L'étude du type de respiration montre que la quasi-totalité des souches de *Bacillus* étaient aéro-anaérobie facultatives (c'est-à-dire qui peut croître en présence et absence de l'oxygène) à l'exception des souches B22, B40, B41, B53, B61, B64 qui se sont avérées des aérobies stricts (Tableau 39).

Tableau 39 : Enzymes respiratoire et type de respiration des souches de *Bacillus*.

souches	Enzymes respiratoires		Type de respiration	
	catalase	Oxydase	anaérobiose	Aérobiose
B22	+	+	-	+
B27	+	+	+	+
B39	+	+	+	+
B40	+	+	-	+
B41	+	+	-	+
B45	+	+	+	+
B47	+	+	+	+
B48	+	+	+	+
B53	+	+	-	+
B59	+	+	+	+
B61	+	+	-	+
B62	+	+	+	+
B63	+	+	+	+
B64	+	+	-	+
B65	+	+	+	+
B67	+	+	+	+
B69	+	+	+	+
B72	+	+	+	+
B73	+	+	+	+
B79	+	+	+	+

IV.6.1.3. Identification biochimique des souches de *Bacillus*

Divers travaux ont montré l'intérêt et la fiabilité du système API 50CHB pour l'identification rapide de la plupart des espèces du genre *Bacillus*. L'API 50CHB est un système standardisé associant 50 tubes biochimiques permettant l'étude du métabolisme des hydrates de carbone par les microorganismes. Il met en évidence, l'assimilation des sucres et leurs dérivés (l'assimilation des sucres simples, l'assimilation des sucres complexes, l'assimilation des polyalcools, des hétérosides et les acides uroniques). Sur la base des résultats du métabolisme des carbohydrates et à l'aide du logiciel d'identification microbienne, les 20 souches intéressantes sélectionnées juste après les tests d'antagonisme antifongique ont

été identifiées comme étant appartenir à 9 espèces différentes de *Bacillus* et espèces apparentées (Tableau 40).

IV.6.1.3.1. Résultats de fermentation des sucres simples

Les 20 souches de *Bacillus* étudiées se sont montrées très différentes en matière fermentation des sucres simples (arabinose, L-arabinose, D-ribose, D-xylose, L-xylose, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, l-sorbose, L-rhamnose, D- trehalose, D-lyxose, D-tagatose, D-fructose, L-fructose). Aussi, ces souches laissent apparaitre une grande variabilité les unes des autres en ce qui concerne la capacité de métaboliser ces sucres. Si la souche B53 se distingue par une négative assimilation des sucres simples, par contre la souche B73 était capable de fermenter tous les sucres simples. Par ailleurs, la caractérisation biochimique révèle que les 20 souches identifiées étaient capables de fermenter les sucres simples à savoir, le D-glucose, D-fructose et D-mannose (Tableau L en Annexe 1).

IV.6.1.3.2. Résultats de fermentation oligosaccharides et polysaccharides

La fermentation des oligo et des polysaccharides (D-maltose, D-lactose, D-melibiose, D-saccharose, D-melzitose, D-raffinose, gentibiose, D-turanose, D-cellobiose, amidon, glycogène) par les *Bacillus* montre une grande variabilité entre les souches de *Bacillus*. Si le D- melzitose a été fermenté par uniquement la B59 et la B73, par contre le glycogène a été utilisé presque par la majorité des souches, le cas de B22, B39, B40...etc. (Tableau M, Annexe 1, figure 34).

IV.6.1.3.3 Résultats de fermentation des polyalcools

La fermentation des polyalcools (glycérine, erythriol , D-adonitol, dulcitol, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, xylit, D-arabitol, L-arabitol) par les 20 souches de *Bacillus* montre que seulement les souches B22 et B41 utilisent le xylit et le L-arabitol n'a été utilisé que par la souche B61 en revanche la souche B73 utilise tous les polyols. Le mannitol, le sorbitol et l'inositol étaient les polyols les plus fermentés par les 20 souches (Tableau N, annexe 1).

IV.6.1.3.4 Résultats de fermentation des hétérosides et acides uroniques

Les 20 souches de *Bacillus* montrent une grande variabilité dans la fermentation des hétérosides (méthyl- β D-xylopyranoside, méthyl- α D-mannopyranoside, méthyl- α D-glucopyranoside, N-acétylglucosamine, amygdaline, arbutine, esculine citrate de fer et

salicine). Aussi, cette variabilité a observé dans la fermentation des acides uroniques (potassium gluconate, potassium 2-cétogluconate, potassium 5-cétogluconate).

L'arbutine, l'esculine citrate de fer sont les hétérosides les plus fermentés par les souches de *Bacillus*, alors que le Potassium 2-cétogluconate, Potassium 5-cétogluconate ont été fermenté par presque toutes les souches sauf par la B22, B72, B73 (Tableau O, annexe 1).

IV.6.2. Récapitulatif des souches de *Bacillus* identifiées

Sur la base des résultats des caractères métaboliques et à l'aide du Catalogue Analytique et du programme d'identification développé par Joffin en (2008), il en ressort que nos résultats montrent que 10 souches avaient 100% de probabilité ou caractères identiques aux souches de référence, ce qui est signifie une excellente identification. Huit (8) autres souches avaient une probabilité comprise entre 92 - 99% de caractères communs avec les souches de références, soit aussi une excellente identification, et enfin deux souches qui avaient une probabilité de 70% soit une bonne identification (Tableau 40).

Les résultats montrent que 20 souches appartiennent à 9 espèces de *Bacillus*. *B.firmus* représentée par une seule souche la B39, *B.amyloliquefceans* (B40 et B45), *B.lentus* (B41, B53, B69 et B79), *B.subtilis* (B48, B62, B67), *B.licheniformis* (B59), *B.cereus* (B63), *B.circulans* (B72 et B73). *Brevibacillus laterosporus* (anciennement *B. laterosporus*, B13 et B22), *Aneurinibacillus aneurinilyticus* (anciennement *B. aneurinilyticus*, B47, B61 et B64).

Tableau 40: Taux de probabilité des souches de *Bacillus* avec les espèces de référence.

Souches	Espèce	Probabilité
B13	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	92%
B22	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	70%
B39	<i>Bacillus firmus</i>	99%
B40	<i>Bacillus amyloliquefceans</i>	100%
B41	<i>Bacillus lentus</i>	100%
B45	<i>Bacillus amyloliquefceans</i>	98%
B47	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	100%
B48	<i>Bacillus subtilis</i>	100%
B53	<i>Bacillus lentus</i>	72%
B59	<i>Bacillus licheniformis</i>	96%
B61	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	99%
B62	<i>Bacillus subtilis</i>	100%
B63	<i>Bacillus cereus</i> 2	98%
B64	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	99%
B65	<i>Bacillus subtilis</i>	100%
B67	<i>Bacillus subtilis</i>	100%
B69	<i>Bacillus lentus</i>	100%
B72	<i>Bacillus circulans</i>	100%
B73	<i>Bacillus circulans</i>	100%
B79	<i>Bacillus lentus</i>	99%

Les colonies isolées sur la gélose nutritive après 48h d'incubation étaient des colonies assez grandes, lisses ou granuleuses, à contour le plus souvent irréguliers. Les colonies bactériennes de *Bacillus* apparues étaient généralement volumineuses, prennent une coloration blanchâtre et opaque composées de cellules produisant des spores.

Les souches bactériennes observées se sont révélées toutes à Gram positif, végétatives dont certaines pouvant croître en conditions aéro-anaérobie (facultatifs), alors que d'autres sont aérobies stricts. Les cellules rencontrées produisent des spores ellipsoïdales, centrales, subterminales et terminales soient déformantes ou non déformantes. Ces caractères rappellent l'aspect des *Bacillus* cités par la littérature (Logan et Turnbull, 2000).

La totalité des souches étaient Catalase (+) et une oxydase variable dont les types morphologiques correspondent à des bâtonnets à Gram positive, sporulés (Larpen, 2000).

Les neuf espèces de *Bacillus* qu'on a identifiées (*B.subtilis*, *B.lentus*, et *aneurinibacillus aneurinilyticus*, *Brevisbacillus laterosporus*, *B.circulans*, *B.licheniformis*, *B.cereus* et *B.firmus*), sont couramment isolés à partir des sols agricoles. En effet, Karimi et al (2012), ont rapporté que le *B.subtilis* est l'espèce la plus abondante dans le sol rhizosphérique du pois chiche. Kumar et al (2014), ont pu isoler un total de 240 *Bacillus* à partir la rhizosphère du pois chiche en Inde. Toutes les souches appartiennent au genre *Bacillus* et espèces apparentées à savoir : *Lysinibacillus fusiformis*, *Lysinibacillus spp*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis* et *Bacillus spp*. En outre, Amin et al, (2015) ont isolé plusieurs espèces de *Bacillus* avec des pourcentages à l'avantage de *B. cereus* (86,6%), *B. subtilis* (6,6%), *B. thuringiensis* (3,3%) et de *B. pumilus* (3,3%). D'autres espèces de *Bacillus* ont été isolés à partir du sol, ainsi, Nouvamo et al (2015), ont rencontré *B.coagulans*, *B.thuriengiensis*, *B.pumilus*, *B.circulans*, *B.firmus*, *B.lentus* et *B.licheniformis* sur la rhizosphère du maïs.

Nos résultats montrent que *B.subtilis* et *B.lentus* étaient les espèces les plus abondantes dans les échantillons de sol rhizosphérique. *B. pumilus* et *B. subtilis* ont rapporté que ces bactéries étaient les plus abondantes dans la phyllosphère de soja. Patil et al (2015), ajoutent que sur 75 souches de *Bacillus* isolées à partir de la rhizosphère de pois chiche, le *B. subtilis* est la souche la plus dominante. Elle aussi dominante dans la rhizosphère du blé (Yueju Zhao et al., 2014). Santos et al. (2006) affirment que les *Bacillus sp.*, sont les rhizobactéries les plus abondants dans le sol ce qui explique leur potentiel compétitif, dans l'environnement en présence avec plusieurs autres microorganismes.

Généralement le sol est le milieu écologique de *Bacillus*, là où ils jouent un rôle dans les cycles du carbone et de l'azote. La résistance des spores et la diversité physiologique des formes végétatives en font des bactéries très ubiquistes que l'on peut isoler du sol, l'eau de

mer, de l'eau douce ou de denrées alimentaires (Todar, 2008). Ces espèces sont essentiellement omniprésentes dans les systèmes agricoles. En effet, vu l'importance écologique et la diversité génotypique et phénotypique des *Bacillus* et genres apparentés constitue toujours un mystère. Plusieurs espèces de *Bacillus* et *Paenibacillus* (*Aneurinibacillus aneurinilyticus* et *Brevisbacillus laterosporus*) peuvent facilement se multiplier en grande partie de sol avec des concentrations de l'ordre de log 3 à log 6 cellules par gramme dans le sol rhizosphérique (Mahaffee et Kloepper, 1997 ; Seldin *et al.*, 1998).

Les résultats obtenus montrent l'identification de trois souches affiliées à l'espèce *Aneurinibacillus aneurinilyticus*, il ne s'agit en fait que de *Bacillus aneurinilyticus* récemment reclassé dans ce nouveau genre Frey et al (2013). Ceci est aussi valable pour *Brevisbacillus laterosporus* représentée par 2 souches, appelée anciennement *Bacillus laterosporus* (Frey et al., 2013). Cette une espèce qui a été isolée aussi de la rhizosphère du pommier en Chine.

Les espèces de *Bacillus* rencontrées, sont la plupart des *B.subtilis*, *B.lentus*, et *Aneurinibacillus aneurinilyticus*. En effet, *B.subtilis* est un exemple de bactéries antagonistes qui agissent habituellement par antibiose et éventuellement par parasitisme et concurrence pour l'espace et les nutriments (Nagórska *et al.*, 2007). Nos résultats montrent que la moyenne d'inhibition de la croissance mycélienne des quatre souches de *B.subtilis*, est de 61%, proche des 75% obtenu par Zhang et Xue (2010), ce qui atteste de son grand potentiel dans la lutte biologique contre *S. sclerotiorum*. Yap Chin Ann *et al* (2015) en étudiant l'effet des *Bacillus* sur la germination des conidies de *Colletotrichum gloeosporioides*, ils ont obtenus l'inhibition 86,2% avec *B.subtilis*, 61,4% avec *B.vallismortis* et 36,3% avec *B. firmus*.

Dans notre étude, nous avons identifié 4 souches de *B.lentus*, dont la B79 qui s'est montré très efficace avec un pourcentage d'inhibition de 65%. Ce résultat va à l'encontre de des conclusions de Noumavo *et al* (2015), qui en étudiant plusieurs rhizobactéries, ils que la majorité ont donné un effet inhibiteur contre *Fusarium verticilloides*, *Aspergillus Ochraceus*, *A. Tamaritii*, et *A. Wantii* alors que *B.thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. firmus* étaient non actives contre ces agents pathogènes.

Les trois souches identifiées (B47, B61 et B64) comme étant *Aneurinibacillus aneurinilyticus* se sont montrés les meilleures inhibitrices du FOC *in vitro* le cas de B61 avec 77% d'inhibition. Nos résultats concordent avec ceux d'Anjali Chauhan *et al.* (2014) qui ont obtenu 83,72% d'inhibition de la croissance mycélienne du *Fusarium oxysporum*. Les mêmes auteurs notent l'effet notable sur la croissance végétale. *Aneurinibacillus aneurinilyticus* est un PGPR bien connu (Nihorimbere *et al.*, 2010). Anjali Chauhan *et al* (2014) affirment que la souche CKMV1 d'*A.aneurinilyticus* isolée à partir de *V. jatamansi* est le premier exemple

connu d'une bactérie capable de solubiliser le phosphate et ainsi doué d'avoir un potentiel possible pour la promotion de la croissance des plantes dans des conditions de terrain en raison de sa croissance des différentes conditions environnementales.

En ce qui concerne *Brevisbacillus laterosporus*, les études taxonomiques récentes basées sur l'analyse de séquence ARNr 16S, cette espèce a été déplacée dans le nouveau genre *Brevibacillus* (Shida, 1996). Nos résultats montrent que les deux souches de *Brevisbacillus laterosporus* avaient un fort taux d'inhibition contre le FOC1, l'exemple de 67% obtenu par la B13. C'est une espèce qui a été isolée à partir d'une rhizosphère de pommier en Chine (Song et al., 2011). Le filtrat de culture de cette espèce, fait monter le niveau d'inhibition à environ 80%, et donne des propriétés de PGPR aux plantes cultivées (Zhang et al., 2001). Dans des expériences spécifiques, *B. laterosporus* a favorisé la croissance de semis de la laitue (Yobo et al., 2004).

Les espèces du genre *Brevibacillus* sont associées à la production d'une large gamme d'enzymes et d'antibiotiques (Chandel et al., 2010). Elles montrent aussi une activité antifongique inhibitrice contre plusieurs champignons pathogènes, *Fusarium oxysporum f. sp. Ciceri*, *F. semitectum Berk.* et *Rhizoctonia oryzae*. La souche ZQ2 de *B. laterosporus* est active contre divers phytopathogènes de pommiers dont *Rhizoctonia solani Kuhn*, *Fusarium oxysporum Schlecht*, *F. solani*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Valsa Sordida Nits*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*.

Le *Bacillus amyloliquefaciens*, représenté par deux souches (B40, B45) s'est montré aussi efficace avec des taux de 70% et 64% successivement. Ces résultats sont en concordance avec ceux de Han et al (2015), où la souche LB01 (*B. amyloliquefaciens*) a produit une forte inhibition contre *Colletotrichum. acutatum* (60.15%) *Colletotrichum. gloeosporioides* (58.12%). Abdllwareth et al (2012), à travers les souches AM1 et D29 de *B. amyloliquefaciens* ont eu une bonne activité antagoniste et pourrait être appliquée comme agents de lutte biologique contre le flétrissement bactérien de tomate en serre à côté de leur potentiel pour promouvoir la croissance des plants de tomates. La souche IK-104 de *B. amyloliquefaciens* était très efficace contre *Fusarium solani* dans des tests in vitro.

Le *Bacillus firmus* identifié en une seule souche à savoir la B39, a montré une forte inhibition in vitro contre le FOC avec un taux 70,50%. Nos résultats sont en concordance avec ceux de Pengnoo et al. (Lemanceau et al., 2009) qui ont constaté que 16 souches de *Bacillus* dont des souches de *B. firmus* avaient la capacité d'inhiber la croissance du mycélium de *Rhizoctonia solani*, agent causal de la brûlure des feuilles du voandzou. Mais nos résultats vont à l'encontre de ceux de Lamari et al (2014), qui n'ont enregistré aucune activité

antifongique de *B. firmus* dans des essais in vitro contre le *Fusarium oxysporum f.s. albedinis* et *Fusarium oxysporum f.s. lini*.

Nous avons rencontré une seule souche de *Bacillus cereus* (B63) avec un pouvoir inhibiteur moyen de 46%. Mansour et al, (2015) affirment que c'est une espèce qui est habituellement isolé à partir du sol. Lamari et al (2014) ont rapporté que *B. cereus* ne produit pas d'antibiotique, mais elle est capable d'inhiber la croissance du *Fusarium oxysporum f.s. lini*. plus que *B.subtilis*. Son pouvoir antifongique ne se limite pas au genre *Fusarium*, mais cette dernière espèce est capable d'inhiber la croissance *A. alternata* *Penicillium chrysogenum*, *F. oxysporum* et *Cladosporium herbarum* (Abou-Zeid, et al., 2009).

En voulant contrôler biologiquement la maladie des fontes de semis de la luzerne (*Medicago sativa* L.), causée par *Phytophthora megasperma f. sp. Medicaginis*, Handelsman et al. (1990) ont constaté que sur 700 souches bactériennes testées, seule la souche UW85 de *Bacillus cereus*, a la mortalité des semis à 0%. Silo-Suh et al. (1994) ont purifié deux antibiotiques produits par *B. cereus* et ont montré que l'un d'eux, désigné zwittermicine A, empêche la maladie des plantules de luzerne causées par *P. medicaginis*.

L'avant dernière espèce à savoir *B. circulans* est représentée par deux souches dont la B73 avait un taux de 65% d'inhibition du FOC, ce qui est en concordance avec les résultats de Noumavo et al (2015), qui ont réussi à obtenir une inhibition de la croissance mycélienne du *Fusarium verticilloides* de l'ordre 48,42%.

En ce qui concerne *B.licheniformis* qui avait inhibé de la croissance mycélienne du FOC de 50%. Pérez-Garcia et al. (2011) affirment qu'elle est capable de coloniser les racines des plantes et de produire des molécules de nature lipopeptidique qui sont les surfactines, les iturines et les fengycines. Ces composés peuvent soit activer les défenses des plantes, soit avoir un effet antibactérien ou antifongique direct.

IV.6.2.1. Caractérisation macro et microscopiques des souches de *Pseudomonas*

Certaines souches de *Pseudomonas* spp. Isolées sur le milieu King B, ont donné des colonies de couleur crème à blanchâtre et d'autre se présentent avec une couleur jaune orangé ou vertes. Les colonies étaient circulaires pigmentées avec des bords réguliers, des reliefs bombés et des surfaces lisses. Seule la souche P53 a présenté des petites plages d'autolyse autour de la colonie donnant un reflet irisé. Presque la majorité des colonies sont translucides avec une consistance visqueuse, conjuguée avec la présence d'une odeur aromatique de seringat qui est assez caractéristique des *Pseudomonas*. La majorité des cellules observées sous microscope optique ont une forme de fine bacilles à Gram négatif (Tableau 41).

Tableau 41: Caractères morphologiques macro et microscopiques des souches de *Pseudomonas*.

souches	Aspect macroscopique						Aspect microscopique		
	Taille	Forme	Opacité	Contour	Couleur	Consistance	Odeur	Forme	Gram
P29	1mm	circulaire	Translucide	Régulier	vert	Visqueuse	+	bacille	-
P30	1mm	circulaire	Translucide	Régulier	jaune	Visqueuse	+	bacille	-
P31	1mm	circulaire	Translucide	Régulier	orange	Visqueuse	+	bacille	-
P36	1mm	circulaire	Translucide	Régulier	orange	Visqueuse	+	bacille	-
P37	1mm	circulaire	Translucide	Régulier	jaune	Visqueuse	+	bacille	-
P39	1mm	circulaire	Translucide	Régulier	brun	Visqueuse	+	bacille	-
P41	1mm	circulaire	Opaque	Régulier	orange	Visqueuse	+	bacille	-
P43	1mm	circulaire	Translucide	régulier	orange	Visqueuse	+	bacille	-
P44	1mm	circulaire	Translucide	régulier	jaune	Visqueuse	+	bacille	-
P45	1mm	circulaire	Translucide	régulier	orange	Visqueuse	+	bacille	-
P46	1mm	circulaire	Opaque	régulier	Jaune	Visqueuse	+	bacille	-
P48	1mm	circulaire	Translucide	régulier	vert	Visqueuse	+	bacille	-
P50	1mm	circulaire	Translucide	régulier	vert	Visqueuse	+	bacille	-
P52	1mm	circulaire	Translucide	régulier	jaune	Visqueuse	+	bacille	-
P53	1mm	circulaire	Translucide	régulier	vert	Visqueuse	+	bacille	-
P57	1mm	circulaire	Translucide	régulier	Jaune	visqueuse	+	bacille	-
P56	1mm	circulaire	Translucide	régulier	Jaune	visqueuse	+	bacille	-
P59	1mm	circulaire	Translucide	régulier	Jaune	visqueuse	+	bacille	-
P61	1mm	circulaire	Translucide	régulier	Jaune	visqueuse	+	bacille	-
P62	1mm	circulaire	Translucide	régulier	Jaune	visqueuse	+	bacille	-
P64	1mm	circulaire	Translucide	régulier	Jaune	visqueuse	+	bacille	-
P65	<1mm	circulaire	Translucide	régulier	orange	visqueuse	+	bacille	-
P66	2mm	circulaire	Opaque	régulier	Jaune-vert	visqueuse	+	bacille	-
P70	2mm	circulaire	Opaque	régulier	Jaune-vert	visqueuse	+	bacille	-

IV.6.2.2. Détermination des types et les enzymes respiratoires

En relatif aux caractères biochimiques, toutes les souches de *Pseudomonas* étudiées se sont avérées aérobies et ont donné une réaction catalase positive alors qu'elles étaient différentes en ce qui concerne l'oxydase. Sur le plan faculté de croissance à 4°C et 41°C, seulement trois souches ont pu croître à 41°C (P29, P37, P48, P44 et P50), alors que la majorité pousse à 4°C. Toutes les souches ont une action positive sur le KOH, c'est-à-dire que ces souches bactériennes sont Gram négatif.

La fluorescence des colonies sur milieu de culture a été observée chez les souches P29, P37, P44, P46, P48, P50, P66 et P70. Elles sont capables d'élaborer un pigment jaune-vert fluorescent sous UV (365nm) diffusible dans le milieu (Tableau 42).

Tableau 42 : Caractères physicochimiques relevés chez les souches de *Pseudomonas*.

Souches	Fluorescence à	Enzymes		Croissance à	Croissance à	KOH
	UV	respiratoires				
	à 365nm	oxydase	catalase	4°C	41°C	
P29	+	+	+	-	+	+
P31	-	-	+	+	-	+
P36	-	-	+	+	-	+
P37	-	-	+	-	+	+
P39	-	-	+	+	-	+
P41	-	-	+	+	-	+
P43	-	-	+	+	-	+
P44	+	+	+	-	+	+
P45	-	+	+	+	-	+
P46	+	+	+	+	-	+
P48	+	+	+	-	+	+
P50	+	+	+	+	+	+
P52	-	-	+	+	-	+
P53	-	-	+	+	-	+
P57	-	-	+	+	-	+
P56	-	-	+	+	-	+
P59	-	-	+	+	-	+
P61	-	-	+	+	-	+
P62	-	-	+	+	-	+
P64	-	-	+	+	-	+
P65	-	-	+	+	-	+
P66	+	+	+	+	-	+
P70	+	+	+	+	-	+

IV.6.2.3. Identification biochimique des souches de *Pseudomonas*

IV.6.2.3.1. Tests conventionnel

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les résultats montrent que la majorité des souches ont pu réduire le nitrate (NO₃), l'hydrolyse d'argénine ADH (+) sauf la souche P48. Toutes les souches ont pu produire l'uréase (Urée +) à l'exception des souches (P29, P36 et P48). En plus, la quasi-totalité des souches ont pu utiliser l'esculine, la gélatine et le PNPG (+), c'est-à-dire qu'elles sont capables de produire l'enzyme β-galactosidase (Figure 33, Tableau P, annexe 1).

IV.6.2.3.2. Tests d'assimilation

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries se cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant (D-glucose, L-

arabinose, D-mannose, D-mannitol, N-acétyl-glucosamine, D-maltose, potassium gluconate, acide caprique, acide adipique, acide malique, trisodium citrate et l'acide phénylacétique.

La plupart des souches ont pu assimiler le D-glucose sauf les souches P39, P50 et P57. Alors que les P37, P39, P57 et la P53 n'ont pu utiliser le L-arabinose. Le N-acétyl-glucosamine a été assimilé par la majorité des souches sauf la P39 et la P48. Alors que l'acide phénylacétique n'a été assimilé que par les souches P36, P37, P45 et P46, (Tableau Q, annexe 1).

IV.6.3. Récapitulatif des souches des *Pseudomonas* identifiées

Sur la base des résultats des caractères métaboliques et à l'aide du Catalogue Analytique et du programme d'identification développé par Joffin en (2008), il en ressort que nos résultats montrent que 6 souches avaient 100% de probabilité ou caractères identiques aux souches de référence, ce qui est signifié une excellente identification. Dix (10) autres souches avaient une probabilité comprise entre 93 - 99% de caractères communs avec les souches de références, soit aussi une excellente identification, et 5 souches ayant plus de 80% de probabilité et enfin 3 une probabilité comprise entre 54 et 66% (Tableau 43).

D'une manière définitive, les 24 souches étudiées appartiennent à cinq espèces de *Pseudomonas*. Les souches P30, P31, P36, P41, P43, P52, P53, P56, P59, P61, P62, P64 sont identifiées comme étant *Pseudomonas luteola* ; P29, P37, P44, P48, P50 sont des *P. aeruginosa* et P46, P66, P70 sont des *P. fluorescens*. Deux autres genres apparentés aux *Pseudomonas* ont été également identifiés à travers les P39 et P45 comme étant *Sentrophomonas maltophilia* (anciennement *Pseudomonas maltophilia*,) et la P57 comme étant *Sphingomonas paucimobilis* (anciennement *Pseudomonas paucimobilis*). Les résultats montrent aussi que *P. luteola* représenté par 13 souches est de loin l'espèce la plus dominante.

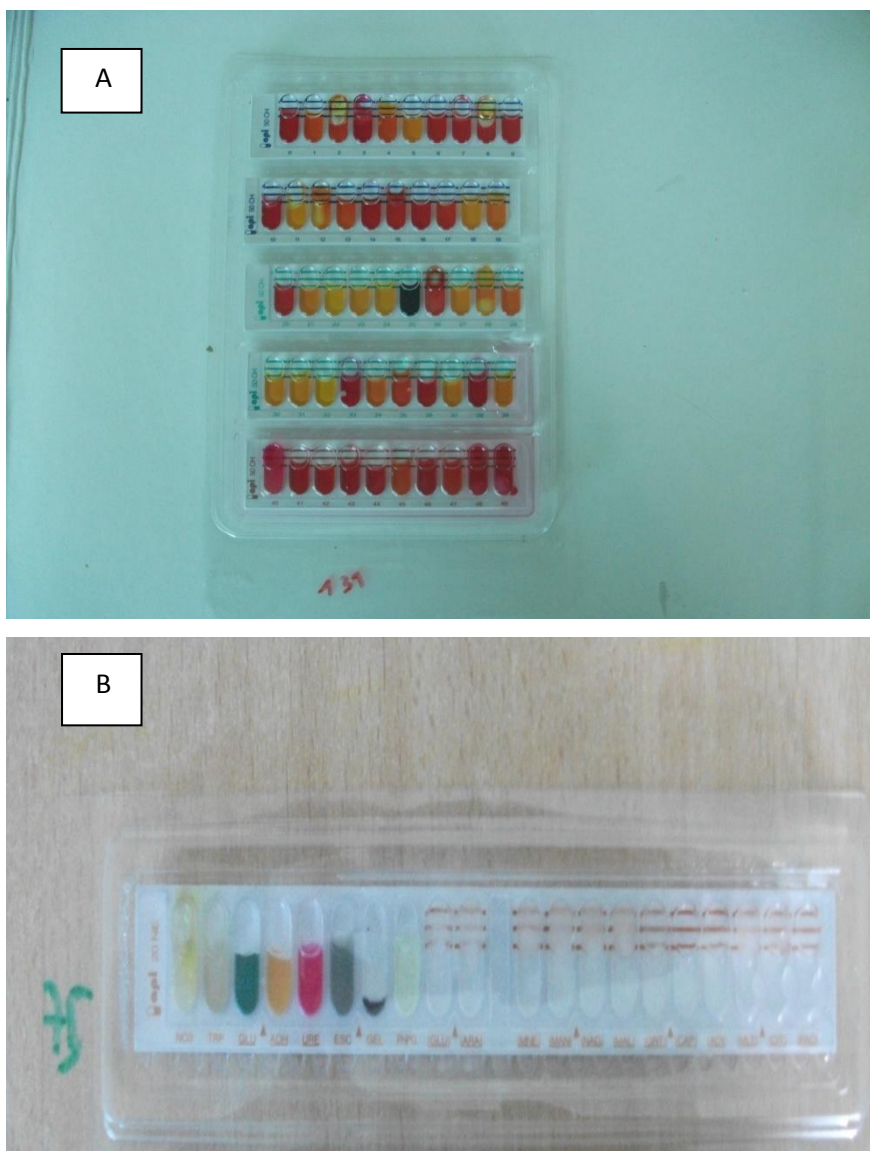


Figure 34: Exemple d'identification des souches, A) Identification de la souche *Bacillus B59* par l'API 50 CHB, B) Identification de *Pseudomonas P29* par l'API 20 NE.

Tableau 43 : Taux de probabilité des souches de *Pseudomonas* avec les espèces de référence.

Souches	Espèce	Probabilité
P29	<i>P.aeruginosa</i>	100%
P30	<i>P.luteola</i>	100%
P31	<i>P.luteola</i>	100%
P36	<i>P.luteola</i>	66%
P37	<i>P.aeruginosa</i>	97%
P39	<i>Sentrophomonas maltophilia</i>	89%
P41	<i>P.luteola</i>	54%
P43	<i>P.luteola</i>	100%
P44	<i>P.aeruginosa</i>	89%
P45	<i>Sentrophomonas maltophilia</i>	83%
P46	<i>P.fluorescens</i>	98%
P48	<i>P.aeruginosa</i>	56%
P50	<i>P.aeruginosa</i>	93%
P52	<i>P.luteola</i>	98%
P53	<i>P.luteola</i>	85%
P56	<i>P.luteola</i>	98%
P57	<i>sphingomonas paucimobilis</i>	89%
P59	<i>P.luteola</i>	98%
P61	<i>P.luteola</i>	100%
P62	<i>P.luteola</i>	97%
P64	<i>P.luteola</i>	95%
P65	<i>P.luteola</i>	99%
P66	<i>P.fluorescens</i>	99%
P70	<i>P.fluorescens</i>	100%

La caractérisation morphologique, biochimique et physicochimique des souches de *Pseudomonas* spp. Isolées sur le milieu King B révèlent en général des caractères habituellement rencontrés avec le genre des *Pseudomonas* (Höfte et Altier, 2010).

En matière de présence spécifique des *Pseudomonas*, *Pseudomonas luteola* vient largement en tête avec treize souches, suivie par *Pseudomonas aeruginosa* avec 4 souches, vient en suite *Pseudomonas fluorescens* avec 3 souches, *Sentrophomonas maltophilia* avec 2 souches et enfin *Sphingomonas paucimobilis* avec une seule souche. (P57). Ces espèces rencontrées sont aussi rencontrés par Landa et al (1997), qui parmi 81 souches isolées à partir la rhizosphère de pois chiche, ils ont trouvé 7 souches de *Pseudomonas fluorescens* et une souche de *Sentrophomonas maltophilia*. Alors que Kaur et al (2007) rapportent que la dominance dans la rhizosphère et la rhizoplane du pois chiche, elle et pour *Pseudomonas fluorescens* avec 90 souches. Si nos résultats donnent la prédominance pour *Pseudomonas luteola*, Mansoureh et al (2012) la trouve au profit *Pseudomonas fluorescens*. Mais, *Pseudomonas luteola* est une espèce qui est habituellement isolé à partir de la rhizosphère du pois chiche Urrea et al (2011). Ces derniers ont pu isolées 123 souches bactérienne à partir du

sol rhizosphérique renfermant entre autre *P. peruviana* et *Pseudomonas luteola* qui douée d'une grande activité antagoniste.

Nous avons rencontré *Pseudomonas aeruginosa* dans cinq souches, ce résultat est en concorde avec Karimi et al (2012) qui parmi les 231 souches isolées à partir du sol rhizosphérique de pois chiche, 4 souches appartenaient à *Pseudomonas aeruginosa* et 2 souches de *P. putida*.

Les membres du genre *Pseudomonas* se trouvent en abondance dans différents habitats parce que leurs conditions alimentaires sont simples et leur polyvalence métabolique est extrême. Cependant, leur capacité d'occuper un certains habitats est limité par des extrémités du pH (toute les deux alcaline ou acide) et elles ne sont pas thermophiles (Palleroni, 1992).

D'autres espèces de *Pseudomonas* sont aussi associées aux racines, et on été isolés de différentes plantes *P. brassicacearum* et *P. thivervalensis* isolés respectivement de plantes d'ail et de riz (Achouak et al ,2000). *P. rhizosphaerae*, *P. luteola*, et *P. argentinensis* isolées de la rhizosphère de l'herbe (Peix et al ; 2003). Certaines ont été isolés de la phylosphère des plantes, c'est le cas de *P. lurida* (Behrendt et al, 2007). Quelques espèces ont été isolées d'écosystèmes marins comme c'est le cas de *P. maricola* (Romanenko et al, 2008), ou encore d'écosystème désertiques *P. duriflava* (Lui et al, 2008). Cette distribution semble être due à une adaptabilité physiologique et génétique élevée (spires et, 2000).

Les résultats obtenus montrent que *Pseudomonas luteola* est le plus dominante et s'est caractérisé par la plus grande efficacité contre le FOC avec une inhibition de la croissance mycélienne de l'ordre de 70%. Elamraoui et al (2013), ont trouvé que sur 50 souches étudiées, *Chryseomonas luteola* était la plus efficace pour le biocontrôle de la fusariose vasculaire du melon. Elle n'est en faite que *Pseudomonas luteola*, déjà cité pour son antagonisme contre *Phytophthora capsisi* par Gyung-Hyun et al. (2001).

On a isolé deux souches identifiées comme étant *Stenotrophomonas maltophilia* ayant un pouvoir inhibiteur important plus de 50%. Landa et al ; (1997), ont isolé RG56 souche de *Stenotrophomonas maltophilia* qui n'a montré aucune action contre le FOC. Aussi, nous avons isolé une seule souche identifiée comme *Sphingomonas paucimobilis* douée d'une activité antifongique contre le FOC1 très importante de l'ordre de 53%.

En ce qui concerne les vraies *Pseudomonas*, on a isolé 5 souches de *P.aeruginosa* qui ont une importante activité antifongique contre le FOC importante atteignant les 50%. Ces résultats sont en concorde avec ceux de Karimi et al. (2012), qui sur les onze souches isolées à partir de pois chiche infectés, ils ont trouvé que 4 souches de *P.aeruginosa* avaient un effet inhibiteur de 40% en duel culture. Saikia et al. (2004) criblées 54 *Pseudomonas* fluorescent

souches obtenus à partir de la rhizosphère de l'haricot pour l'antagonisme contre *Macrophomina phaseolina* et *R. solani* et a signalé que la souche *P.aeruginosa* RsB29 a provoqué la suppression de la fusariose et la pourriture charbonneuse du pois chiche, et a favorisé la croissance des plantes de la fève. Ramette et al. (2006) ont constaté que les populations de *Pseudomonas* vivant dans la rhizosphère ont pu éradiquer la pourriture du tabac à travers les composés volatiles le cas du Cyanure d'hydrogène.

Les trois souches de *Pseudomonas fluorescens*, ont donné une moyenne d'inhibition égale à 45% *in vitro*. Sundaramoorthy et Balabaskar (2013) ont remarqué que les souches de *P. fluorescens* et *B. subtilis* isolées à partir du sol rhizosphérique de la tomate avaient un effet inhibiteur de 30%. En plus, la combinaison des deux espèces provoque une forte réduction du flétrissement de la tomate et une augmentation du poids sec des plants de tomates de 27% par rapport au contrôle non –traité par les bactéries.

IV.7. Effet des conditions physicochimiques du milieu sur la croissance

Sur la base des meilleurs résultats de l'antagonisme *in vitro*, douze souches bactériennes appartenant aux deux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* ont été sélectionnées et ont subies une série de test afin d'étudier un certain nombre de caractères physicochimiques.

IV.7.1. Effet du pH sur la croissance bactérienne

Globalement, les douze souches étudiées se comportent d'une manière plus ou moins différente à la variation du pH du milieu de culture, quoique la totalité se sont développées dans les différents pH étudiés. En résumé, les résultats nous donnent que le pH 7 est le plus favorable pour la croissance des souches B39, B59, B65, B73, P53, P65, P70. Cependant le pH 8 est optimal pour le développement des souches B63, B40, P66. Alors que le pH de 9 est le milieu favorable pour la croissance de B63. Alors que le pH de 6 est le milieu favorable pour la croissance de P70 (Tableau R, annexe 1).

Les souches se sont bien développées à un pH neutre égal à 7, dont la DO à 600nm variait entre 0,057 à 0,346, se présentant comme le pH optimal pour la totalité des souches étudiées. Ainsi, le pH 9 ralentie la croissance des souches où la DO à 600nm varie entre 0,001 pour la P70 et 0,314 pour la B63. En revanche, le pH légèrement acide égal à 6 semble plus favorable au développement uniquement des souches P70 et P66, et complètement létal pour le reste des souches. (Figure 35).

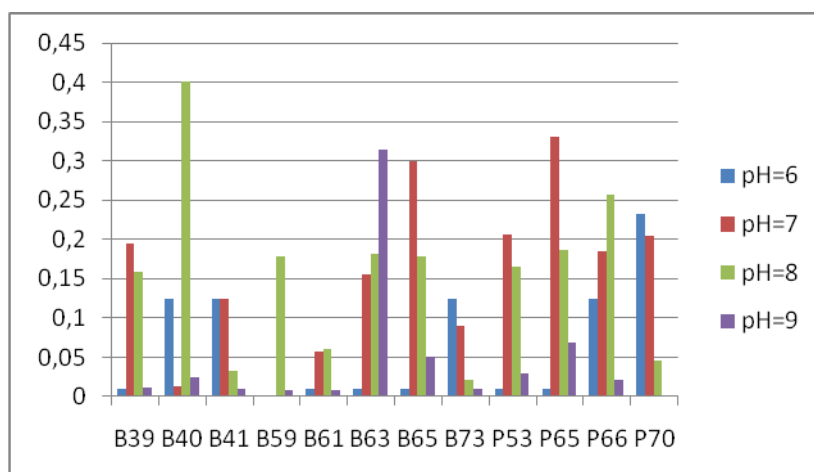


Figure 35 : Croissance des souches bactériennes mesurée en DO en fonction du pH.

D'une manière générale, les *Bacillus* se développent bien à un pH neutre, ceci concorde parfaitement avec les résultats de Jemni Monia et al (2010). D'après Zhou J.W. et al. (2007), les bacilles peuvent croître dans un domaine de pH compris entre 3 et 9 et le pH optimal de croissance des bacilles est aux alentours de 7. Pakpitcharoen et al. (2008), ont montré que 13 souches de *Bacillus* isolées à partir d'échantillons du sol et d'eau en Thaïlande ont pu être cultivées dans un intervalle de pH allant de 5 à 9.

Pour les *Pseudomonas*, le pH de 9 ralentit ou inhibe la croissance des souches le cas de P66, par contre le pH 7 est l'optimum pour leur croissance. Muriel (1959), a rapporté que *Pseudomonas fluorescens* peut croître entre un pH égal 5,5 et 8,6.

IV.7.2. Effet du NaCl sur la croissance bactérienne

La majorité des souches ont pu se développer dans un milieu ayant 50mM de NaCl. La densité optique maximale a été enregistrée avec la B63 en obtenant une DO égale à 1,449, alors qu'elle a réduit d'une manière drastique la croissance des souches B39 et B61 on n'a eu que des DO égales à 0,09 et 0,026, respectivement.

La concentration 100mM d'NaCl était favorable pour la majorité des souches et beaucoup plus pour la croissance de la B40 avec une DO égale à 0,649. Alors qu'elle est complètement défavorable pour la P66, avec uniquement une DO de l'ordre de 0,10. En augmentant la concentration du NaCl, le milieu devient beaucoup plus favorable pour les souches de *Pseudomonas* que les *Bacillus* (Tableau S, annexe 1). Nos résultats montrent que les souches de *Pseudomonas* sont plus halotolérante que les souches de *Bacillus* (Figure 36).

Dans leur habitat naturel, les microorganismes sont fréquemment exposés à des variations de pression osmotique du milieu environnant. En effet, la salinité élevée du sol peut interférer avec la croissance et l'activité des bactéries. Une diminution de celle-ci dans les sols salins conduit à une accumulation de la matière organique non dégradée, ce qui agit négativement sur la disponibilité des nutriments nécessaires à la croissance végétale (Zahran, 1997). Un sol est considéré salin si sa conductivité électrique (CE) est supérieure à 4 (dS/m) ; cette valeur correspond à 40 mM de NaCl (2,4 g/l) (Hillel, 2005).

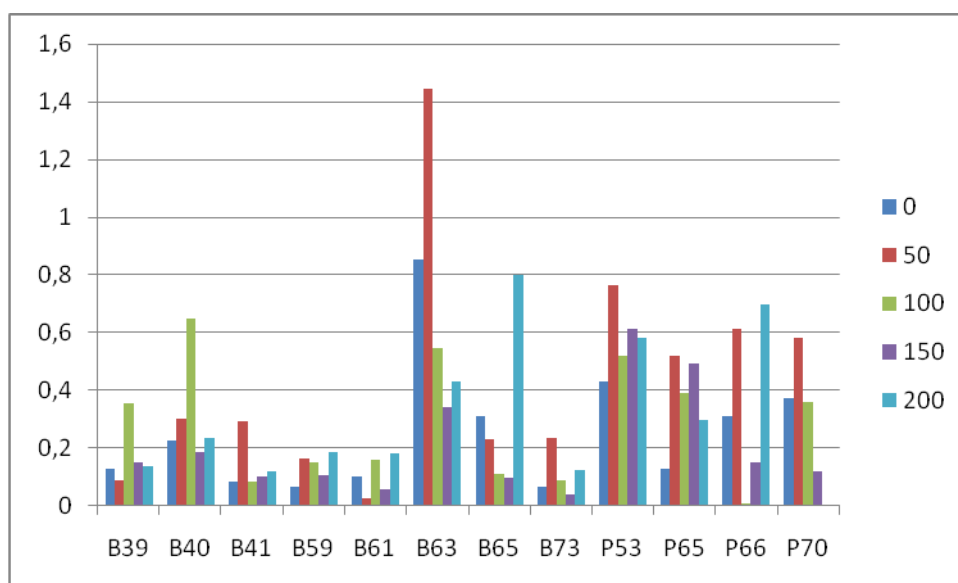


Figure 36 : Croissance des souches bactériennes mesurée en DO en fonction de différentes concentrations de NaCl.

Les résultats obtenus de l'effet de la variation de la concentration du NaCl sur la croissance microbienne, montrent que les douze souches arrivent à se multiplier dans un milieu salin et donc peuvent être qualifiées de souches halotolérantes. Selon le *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (7^{ème} ed., 1957), *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilis*, *B. coagulans* et *B. badius* se sont développées dans un milieu ayant 7% de salinité soit l'équivalent de 119,78mM de NaCl et *B. panthotenticus* à 10% (171,11mM) de NaCl. Selon le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 3 (2^{ème} ed., 2009), *B. gibsonii*, *B. agaradhaerens*, *B. alcalophilus* et autres alcaliphiles se sont développées à 9% soit 154 mM de NaCl. Berber et Yenidunya (2005) ont montrés que 17 espèces de *Bacillus* isolées à partir des eaux du Lac Van et du sol l'entourant se sont développées dans un milieu contenant 2% de NaCl (34,22mM) et 5% (85,55mM). Ainsi, Mohanty et al. (2011) ont montré que 11 souches de *B. cereus* isolées à partir des écosystèmes d'eau douce ont pu croître à 5% de NaCl

mais incapables de se développer à 10% d'NaCl. Ventosa et al. (1998), ont rapporté que les *Bacillus* sont capables de croître à 24% de NaCl.

En ce qui concerne les *Pseudomonas*, nos résultats montrent que les souches étudiées peuvent croître à 200mM d'NaCl, le cas de P53 et P66 qui sont des holohpiles. Ventosa et al (1998), en utilisant des milieux contenant entre 12 et 18% de sel, une souche de *Pseudomonas beijerinckii* a été isolée à partir de fèves salées conservés dans des saumures en faisant varier la concentration en sel de 6 à 29%.

IV.8. Conclusion

Au total 151 souches ont été isolées à partir de la rhizosphère, le sol qui adhère aux racines. L'identification se fait sur la base des caractères morphologique et biochimique des souches les plus actives contre le FOC *in vitro*. A travers des tests d'identification standardisés, nous avons pu mettre en évidence l'existence de cinq espèces affiliées aux *Pseudomonas* et neuf espèces au groupe des *Bacillus* et *Pseudomonas* sont extrêmement variables. Le groupe des *Bacillus* renferme, *B.subtilis*, *B.lentus*, *B.licheniformis*, *B.circulans*, *B.cereus*, *B.firmus*, *B.amyloliquefaciens* et aussi *Aneurinibacillus aneurinilyticus* et *Brevisbacillus laterosporus*. Alors que le groupe des *Pseudomonas*, comprend *P.luteola*, *P.aeruginosa*, *P.fluorescens* et également *Sentrophormonas maltophilia* et *sphingomonas paucimobilis*.

Les résultats obtenus de l'effet de la variation de la concentration du NaCl sur croissance microbienne, montrent que les douze souches arrivent à se multiplier dans un milieu salin et donc peuvent être qualifiées de souches halotolérants. Alors que pour l'effet de pH d'une manière générale, les *Bacillus* et les *Pseudomonas* se développent bien à un pH neutre. Par contre le pH égale de 9 ralentit la croissance et la densité des bactéries.

Chapitre V

*Détermination des substances
impliquées dans l'antagonisme bactérien*

Chapitre V : Détermination des substances impliquées dans l'antagonisme bactérien

V.1. Introduction

Certaines bactéries sont utilisées pour améliorer le développement de la racine *via* la production de phytohormones (Bloemberg et Lugtenberg, 2001) telles les auxines dont l'acide indole acétique (AIA), les cytokinines et les gibbérellines (Steenhoudt et Vanderleyden, 2000; Vessey, 2003; Barea *et al.*, 2005). Les bactéries ayant la capacité de promouvoir l'établissement des mycorhizes en améliorant le contact des champignons avec les racines des plantes hôtes et la colonisation de ces racines, sont appelées MHB (Mycorrhiza Helper Bacteria) (Garbaye, 1994). Par ailleurs, de nombreuses bactéries sont capables d'améliorer la santé des plantes en limitant la croissance des microorganismes phytopathogènes. Certaines sont utilisées en agriculture comme agents de lutte biologique (Bloemberg et Lugtenberg, 2001; Whipps, 2001). Ces bactéries existants à l'état libre dans la rhizosphère et dont l'effet global favorise la croissance de la plante (Lemanceau, 1992) sont désignées collectivement par le terme PGPR (Kloepper et Schroth, 1978).

Les rhizobactéries sont capables d'avoir un effet protecteur en induisant des mécanismes de défense chez les plantes par la résistance systémique induite (ISR : Induced Systemic Resistance) (Van Loon, 2007) permettant aux plantes de mieux se protéger contre l'attaque éventuelle de pathogènes. D'autres bactéries peuvent contrôler la croissance des pathogènes par la compétition pour les éléments nutritifs, comme par exemple, pour le carbone (Handelsman et Stabb, 1996) et pour le fer dont la biodisponibilité dans le sol est très faible (Lemanceau *et al.*, 2009). L'antagonisme microbien lié à la production de métabolites ayant des propriétés antibiotiques est également un mécanisme par lequel les bactéries rhizosphériques protègent les plantes contre les phytopathogènes (Mazurier *et al.*, 2009).

Le présent chapitre s'intéresse à l'étude des différents métabolites bactériens impliqués dans l'antagonisme antifongique. Il s'agit principalement des enzymes, des sidérophores, des antibiotiques diffusibles et volatiles. Aussi, certains effets PGPR ont été déterminés en l'occurrence, l'indole acide acétique, la solubilisation des phosphates, la production de l'ammoniac, etc.

V.2. Matériel et méthodes

V.2.1. La production des enzymes

V.2.1.1. Production de la Phosphatase

Les bactéries solubilisant le phosphate sont communes dans la rhizosphère, cette dernière étant le siège de nombreuses interactions entre les plantes et les divers microorganismes associés. La sécrétion d'acides organiques et de phosphatases facilitent la conversion de formes insolubles de phosphore en formes disponibles pour les plantes (Kim *et al.*, 1998; Richardson, 2001). Les *Pseudomonas* spp. fluorescents comme *P. chlororaphis*, *P. putida* et *P. aeruginosa* ont été identifiés comme des rhizobactéries solubilisant le phosphate (Cattelan *et al.*, 1999; Bano et Musarat, 2003).

La solubilisation des phosphates a été évaluée qualitativement sur le milieu de Pikovskaya (Ahmad *et al.*, 2008). Les bactéries isolées sont déposées sous forme de spots (5µl) de cultures fraîches sur gélose de Pikovskaya, à raison de trois répétitions, incubés pendant 96h à 28°C. Le diamètre total (diamètre du halo + diamètre de la colonie) est mesuré. Le diamètre du halo de solubilisation pour chacune des souches est déterminé en soustrayant le diamètre de la colonie du diamètre total.

V.2.1.1.2. Quantification des la phosphatase

Des aliquotes de 100µl (10^7 cellule/ml) de cultures fraîches sont inoculées dans le milieu liquide de Pikovskaya, à raison de trois répétitions, incubés pendant 7jours à 28°C sous agitation à 150 rpm. Les cultures liquides sont centrifugées (4000g/15min). La concentration de phosphatase est estimée par la méthode de (Fiske et Subbarow, 1925; Saravanakumar *et al.*, 2013). 750µl de surnageant est mélangé avec 750µl de réactif (molybdate ammonium ((NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O) 1.5% (w/v), acide sulfurique (H₂SO₄) 5.5% (v/v) et sulfate de fer (FeSO₄) 2.7% (w/v). L'absorbance est mesurée à 700nm par spectrophotomètre (Jan). La quantité de phosphate solubilisée est déterminée d'après la courbe d'étalonnage de phosphate potassium dihydrogène (KH₂PO₄) (Athakorn Promwee *et al.*, 2014).

V.2.1.2. Les enzymes dégradant les parois cellulaires (CWDE)

Beaucoup de microorganismes produisent et libèrent les enzymes lytiques qui peuvent hydrolyser une grande variété de composés polymères, y compris la chitine, des protéines, la cellulose, l'hémicellulose et l'ADN. Ce sont tous nocifs aux microorganismes et améliorent plus loin l'efficacité du biocontrôle (Whipps, 2001, Varma *et al.*, 2004).

L'expression des exoenzymes est directement liée à l'activité des phytopathogènes (ordentlich et al, 1998). Ceci, nous poussé à étudier l'activité et la production des enzymes qui ont relation directe avec le pouvoir antagoniste ou l'effet PGPR.

V.2.1.2.1. Les enzymes protéolytiques

L'activité protéolytique a été déterminée selon la méthode de Smibert et Krieg (1994), par la mise en culture pendant deux jours d'incubation à 28°C des isolats sur gélose au lait écrémé. Le développement d'un halo autour des colonies indique une réaction positive (Naik et Sakthivel, 2006).

V.2.1.2.2. Production de la Cellulase

La production de cellulase est déterminée selon la méthode décrite par Cattelan *et al.* (1999). La gélose M9 (Miller, 1974) supplémentée de 10g de cellulose et 1.2g d'extrait de levures, est utilisée pour tester le pouvoir hydrolytique par la production de cellulase. Les souches sont étalées puis incubées pendant 8 jours à 28°C. Le développement d'un halo clair autour des colonies indique une réaction positive (Verma *et al.*, 2007).

V.2.1.2.3. Production de la Chitinase

La chitine se trouve chez les champignons et constitue 22 à 44% des parois cellulaires des hyphes mycéliens. La chitine est associée à des glycoprotéines (Muzzarelli, 1977; Ruiz-Herrera et Martinez-Espinoza, 1999). Les enzymes bactériennes de type chitinase ont été impliqués dans la protection contre les parasites dans les champignons, les protozoaires et les invertébrés, et surtout dans la dégradation des micelles d'agents pathogènes fongiques.

L'activité chitinase (β -1,4-glucosamine polymère dégradation) a été testée avec un minimum de moyen selon Chernin et al. (1995). La gélose M9 supplémentée de 2% de la chitine, et après cinq jours d'incubation, l'observation de la zone de dégradation autour les colonies est synonyme de production de chitinase.

V.2.1.2.3. Production de la lipase (Triacylglycerol acylhydrolase)

Une gélose en boîte de Pétri, additionnée de tween 80 (monoléate de sorbitol) à 16ml/l, est ensemencée en pique (ou par spots) à partir d'une culture en milieu solide de la souche à étudier. Après une incubation à 37°C pendant 24 à 48h, les colonies de souches lipase (+) sont entourées d'un halo opaque formé suite à la précipitation d'acides gras issus de la lipolyse (Matter, 2002).

V.2.1.2.4. Recherche d' α -amylase

Dans le milieu gélose à l'amidon, on fait un ensemencement par touche à la surface du milieu et on incube à 30°C pendant 48 heures. Quand les colonies bactériennes sont évidentes, on inonde la boîte de Pétri avec la solution de Lugol et on laisse agir pendant 2 mn. Si les colonies sont entourées par un éclairage, on déduit que l'amylase est produite (Prescott's, 2002).

V.2.2. Synthèse des sidérophores

Les sidérophores sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire, compris entre 200 et 2000 daltons, dont le rôle sert de solubiliser, de chélater et d'extraire le fer ferrique à partir de nombreux complexes minéraux ou organiques et de les rendre ainsi accessibles aux microorganismes (Neilands, 1995). La détection de la synthèse des sidérophores a été réalisée dans le milieu O-CAS (overlayered chrome azurol S) en boîte de Pétri selon les méthodes modifiées décrites par Pérez-Miranda *et al.* (2007).

Le milieu CAS est préparé selon Schwyn et Neilands (1987), mais ne contenant pas de substances nutritives et l'agar est remplacée par l'agarose comme substance gélifiante. A cet effet, les bactéries sont cultivées sur le King B pendant 18h à 28°C. La détection des sidérophores est accomplie en recouvrant la culture bactérienne de 10ml de milieu CAS modifié. Après, au moins 15 min un changement de couleur dans la couche de gel rajoutée autour des colonies du microorganisme producteur est observé. La couleur vire du bleu vers le pourpre pour les sidérophores de type catéchol, et du bleu vers l'orange pour les sidérophores de type hydroxamate (Schwyn et Neilands, 1987).

V.2.3. Synthèse de l'acide indole acétique (AIA)

L'AIA est une phytohormone impliquée dans l'initiation de la division des cellules au niveau des racines et de leurs élargissements (Salisbury, 1994). Elle est communément produite par les rhizobactéries (Barazani et Friedman, 1999). Les rhizobactéries produisant l'AIA sont connues pour leurs capacités à augmenter la croissance et la longueur des racines. Cet effet résulte en une surface racinaire plus grande, et une accessibilité pour plus de nutriments pour la plante.

La détermination la production de l'AIA consiste à ensemencée une colonie isolée sur gélose Lauria_Bertani additionnée de 5Mm de L_ tryptophane. La gélose est recouverte de papier whatman numéro 1 (80mm de diamètre), puis incubée à 28°C. Le papier est

récupéré, puis traité avec le réactif de Salkowshi (2% de FeCl_3 à 0.5 mM dans 35% d'acide perchlorique). Les disques de papier filtre sont saturées dans une boîte de pétri en les plongeant dans le réactif, après 10 à 30min. Suite à cela, les analogues de l'AIA se manifestent par l'apparition de la couleur jaune à jaune-brun (Naik et Sakthivel, 2006).

V.2.3.1. Quantification de l'AIA

La quantification d'AIA et de ses dérivés a été évaluée par une méthode colorimétrique (Loper et Scroth, 1986; Bric *et al.*, 1991; Glickmann et Dessaux, 1995). Un volume de 100 μl d'une culture fraîche (Absorbance 600 = 0.07) sont inoculées dans 100ml de TSB (Tryptic Soy Broth) dilué au demi, et additionné de L-tryptophane (200 $\mu\text{g/ml}$). Après une incubation à 28°C et à l'obscurité pendant 72h et sous agitation permanente (150 rpm), les cellules sont séparés par centrifugation (4000g /10min), et le surnageant est filtré. A 1ml de filtrat, 2ml du réactif de Salkowski sont ajoutés, la suspension est homogénéisée puis incubée à l'obscurité pendant 20min, l'absorbance est mesurée à 535 nm (Gravel *et al.*, 2007).

Le développement d'une coloration rose est l'indicateur de la production d'AIA (Tarnawski *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2008). La concentration d'AIA et de ses dérivés, est obtenue par extrapolation des valeurs des souches productrices par rapport à une courbe standard, établie à partir d'une série de dilutions d'AIA (Sigma-Aldrich) à 50 $\mu\text{g/ml}$ dans du TSB (Gravel *et al.*, 2007).

V.2.4. Production des métabolites volatiles

V.2.4.1. Production des antibiotiques volatiles (HCN)

Le HCN est produit par beaucoup de rhizobactéries et est postulé pour jouer un rôle dans la lutte biologique contre les microbes pathogènes (Defago *et al.*, 1990). Sur un milieu de Gélose nutritive additionnée de 4.4g/l de glycine, les souches bactériennes sont ensemencées par strie et des disques de papier whatman numéro 1 saturés en picrate alcalin sont déposés dans les couvercles des boîtes. Ces dernières sont scellées au parafilm et incubées inversées à 28°C pendant 4 jours. Le virage de la couleur jaune à brun clair ou rouge brun indique respectivement une production modérée et élevée d'HCN par la souche bactérienne.

V.2.4.1.2. Quantification de l'HCN

La cyanogénèse a été évaluée sur milieu liquide selon la méthode décrite par Meena *et al.* (2001), où les souches bactériennes sont cultivées pendant 48h à 28°C sous agitation (180rpm) dans des Erlenmeyer contenant 50ml de TSB. Des bandelettes de papier Whatman n° 1 (0.5/10cm) saturées avec une solution de picrate alcaline, sont suspendues verticalement dans ces Erlenmeyer. Le picrate de sodium présent dans le papier change de couleur en fonction de la production d'HCN (Verma *et al.*, 2007). La quantification d'HCN produit est mesurée par absorbance à 600nm sur un spectrophotomètre suite à une lecture des papiers filtre déposés dans des tubes à essai contenant 10ml d'eau distillée stérile.

V.2.4.2. Production de l'ammoniac

Ce test qualitatif est réalisé selon la méthode de Capuccino et Sherman (1992). Il consiste à inoculer 100µl de la suspension bactérienne dans 10ml d'eau peptonée (EP) (Cheminova). Après une incubation 30°C pendant 96 h, 500µl du réactif de Nessler (Prolabo) sont ajoutés dans chaque tube de EP. Le développement d'une couleur jaune ou orange indique la production de l'ammoniac (NH₃).

V.3. Résultats et discussion

V.3.1. Production des enzymes

V.3.1.1. Solubilisation du phosphate

La capacité de solubilisation des phosphates par une souche bactérienne est révélée sur un milieu solide à travers l'apparition d'un halo de transparence autour de la colonie après 3 jours d'incubation à 30°C.

Les résultats nous montrent que sur les 35 souches de *Bacillus* testées, seules deux souches à savoir la B53 et la B74 étaient capables de produire un halo de solubilisation autour de la colonie dont le diamètre est égal à 4mm. Dans le cas des *Pseudomonas*, sur les 31 souches testées, 18 souches étaient capables de produire un halo de solubilisation autour de la colonie dont les diamètres varient de 14 à 16mm (Figure 37, Tableau 44).

En ce qui concerne la détermination quantitative du phosphate soluble sur milieu liquide PVK après 7 jours d'incubation à 28°C. Les résultats obtenus nous révèlent que les quantités de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ solubilisées par les souches varient de 0 à 284,50µg/ml. Le fait que l'halo de solubilisation est parfois difficile à observer, la mesure des quantités de phosphate solubilisée est un test beaucoup plus précis. En effet, malgré l'absence de halo avec la souche B39 sur le milieu solide, nous avons enregistré une quantité maximale de solubilisation égale à 284µg/ml sur le milieu liquide. Dans le cas des *Pseudomonas*, la souche P65 s'est montrée comme la plus efficace avec une solubilisation de l'ordre de 284,50µg/ml.

Certaines souches se sont montrées moyennement productrices de phosphate telles que la souche P48 avec 149µg/ml, la B61 avec 122,50µg/ml. En revanche d'autres n'ont donné que des taux faibles le cas de la P56 (10,50µg/ml), P25 (21,50µg/ml). Alors que les souches B40, B53, P53, P70, P45, P39 étaient incapables de solubiliser les phosphates.

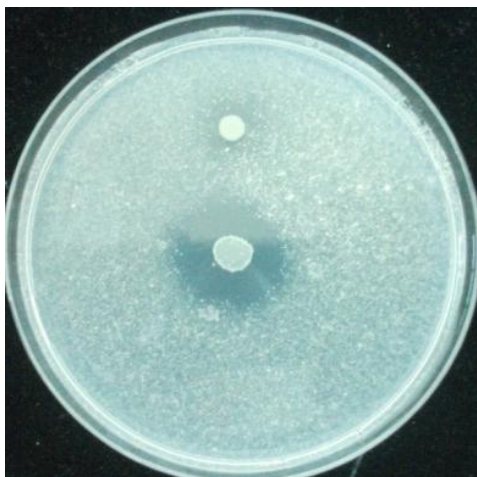


Figure 37: Halo présent autour de la colonie bactérienne synonyme de production de phosphatase sur le PVK.

Tableau 44: Production de la phosphatase par les isolats bactériens rencontrés.

Bacillus	Phosphatase	Diamètre	Conc. P (mg/l)	Pseudomonas	Phosphatase	Diamètre	Conc. P (mg/l)
B39	-	-	284	P25	+	10mm	21,50
B40	-	-	0	P29	+	7mm	0
B41	-	-	nd	P30	+	14mm	81,50
B45	-	-	nd	P33	+	14mm	110
B46	-	-	nd	P39	+	4 mm	0
B53	+	4mm	0	P45	+	6mm	0
B59	-	-	nd	P48	+	4mm	149
B61	-	-	122,50	P53	+	6mm	0
B63	-	-	0	P56	+	8mm	10,50
B64	-	-	nd	P59	+	14mm	nd
B65	-	-	nd	P61	+	4mm	78
B69	-	-	nd	P62	+	4mm	nd
B70	-	-	nd	P65	+	10mm	284,50
B72	-	-	nd	P66	+	16mm	75
B75	+	4mm	10,50	P69	+	2mm	nd
B77	-	-	nd	P70	-	-	0
B79	-	-	nd	P71	-	-	33

nd : non déterminée.

Les bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate sont comme des agents biofertilisants en agriculture (Sharma et al., 2007). Les *Bacillus* possèdent plusieurs mécanismes ayant des effets bénéfiques sur les plantes. L'une des principales activités améliorant la croissance des végétaux est l'alimentation phosphatée.

Les résultats de la présente étude montre que la quantité de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ solubilisée par les souches varie de 0 à 284,50 $\mu\text{g/ml}$. Le *Bacillus* (B39) et *Pseudomonas* (P65) ont produit presque la même quantité, 284 et 284,50 mg/l de phosphate soluble dans le bouillon PVK. Ces niveaux de phosphate sont très proches de ceux obtenus par de nombreux chercheurs. Perez et al (2007) ont montré que *Pseudomonas putida* a produit une quantité maximale égale à 247mg/l. Ramachandran et al. (2007) ont qualifié la souche NBRI 4014 de *Pseudomonas* comme un puissant agent de solubilisation de phosphore avec une production de 284 g/ml. (Patel et Parmar, 2013). Alors que la souche S2 (*Pseudomonas sp.*) a produit la quantité la plus élevée du phosphate soluble de 373,07 mg/l suivie par la souche S30 (*Bacillus sp.*), qui a produit 368,58 mg/l.

Dans les tests qualitatifs, la visualisation d'un halo autour de la colonie bactérienne est synonyme de solubilisation des phosphates ; il n'est pas toujours vérifié dans les tests quantitatifs. Dans le cas de certaines souches ou aucun halo de solubilisation n'a été observé, ils ont quand même produit des quantités maximales autour des colonies, le cas de la souche B39 sur milieu solide, cette dernière atteint la quantité maximale de solubilisation (284mg/l) sur milieu liquide. Ces résultats sont en concorde avec ceux de Cherif et al. (2014).

Les milieux liquides offrent la meilleure détection de la solubilisation du PTC (Phosphate tricalcique) que les milieux solides, comme l'attestent les performances de la plupart des souches de *Bacillus*. La diffusion des acides produits est aisée en comparaison avec les milieux solides où la circulation des molécules est limitée. Ainsi, les souches sur milieux solides peuvent ne pas utiliser la même voie métabolique que celle utilisée sur milieux liquides. La dégradation des substrats varie d'un isolat à l'autre en raison de la variabilité génétique. L'utilisation d'une source de carbone par un organisme dépend de son système enzymatique (Brock et al., 1994).

Les milieux solides peuvent être adaptés à un examen préliminaire. La disponibilité des nutriments en milieu solide est en quelque sorte restreinte en raison de la disponibilité en eau. Parallèlement les microorganismes dans le sol se trouvent dans des conditions identiques de disponibilité des éléments nutritifs en raison des propriétés du sol. Les milieux solides reflètent de plus près les conditions du sol (Cherif, 2014). Lors de la solubilisation du

phosphate en milieu liquide, les bactéries à Gram négatif acidifient l'espace périplasmique par une oxydation directe du glucose. Ceci conduit à la libération de différents acides organiques tels les acides lactique, gluconique, isobutyrique, acétique, glycolique, oxalique, malonique et succinique. L'acide gluconique est fréquent chez les espèces de *P. aeruginosa*, *cepacia* et *fluorescens*. Au fait les acides organiques sécrétés, afin de solubiliser le phosphate, circulent difficilement en milieu solide. Alors que ce n'est pas le cas en milieu liquide (Nautiyal, 1999).

La faible quantité obtenue de phosphate chez les souches B40, B53, P53, P70, P45, P39 (0µg/ml), P56 (10,50µg/ml), P25 (21,50µg/ml) en milieu liquide seraient s'expliquées par leur déficience enzymatique. En effet, la disponibilité de formes solubles du phosphate dans le milieu entraîne leur association avec les acides organiques libérés, en formant des composés Juiorgano-phosphatés. Ces derniers seraient difficiles à dégrader par les souches bactériennes de *Pseudomonas* (Chaiharm et Lymyong, 2009).

V.3.1.2. Production d'enzymes dégradantes la paroi cellulaire

Les analyses attestant la production de divers enzymes jouant un rôle dans la dégradation de la paroi cellulaire fongique révèlent que sur les 35 souches de *Bacillus* testées, 7 souches n'étaient pas capables d'hydrolyser la cellulose, à savoir les souches suivantes : B39, B46, B53, B54, B64, B65 et B78. En revanche, la B14 et la B22 se sont avérées fortement hydrolytiques de cellulose (+++) (Tableau 45, Figure 38).

En ce qui concerne les souches de *Pseudomonas*, 12 souches sont complètement inactives envers la cellulose sur un total de 31 souches testées (Tableau 25). Alors que la P65 et la P61 se sont montrées les deux meilleurs souches (++) capables de produire la cellulase.

Concernant la deuxième enzyme à savoir l'amylase, il en ressort que toutes les souches de *Bacillus* ont pu produire cette enzyme et d'une manière assez forte, alors que les qu'uniquement 7 souches de *Pseudomonas* n'étaient pas capables de produire l'amylase ; à savoir P29, P31, P37, P44, P50, P59, P65). Parmi les souches amylase positive, 12 souches étaient fortement actives (P41, P45, P48, P53, P66, P69,...). (Tableau T, annexe 1).

Les résultats pour la production la Caséinase rejoignent un petit peu ceux de l'amylase chez les *Bacillus*, puisque 34 sur les 35 souches testées étaient capables de produire cette enzyme alors que dans le cas des *Pseudomonas*, cinq souches sont négatives. En ce qui concerne, la production la Gélatinase montrent que 24 sur 35 souches de *Bacillus* l'ont produit alors que seules 18 souches sur les 31 de *Pseudomonas* ont produit cette enzyme.

Concernant la chitinase, il en ressort que presque toutes les souches de *Bacillus* ont pu produire cette enzyme et d'une manière assez forte sauf B39, B42, B48, B59, B75 qui se sont montrées inactives. La B53 s'est montrée comme la meilleure souche productrice de la chitinase avec un diamètre de 25mm. Aussi, la B22, B63, B73, B78, et B53 sont également fortement actives avec des zones de dégradation plus de 20mm. Par contre, une seule souche s'est montrée faiblement active sur la chitine par une zone de dégradation de 6mm.

Dans le cas des *Pseudomonas*, 11 souches n'étaient pas capables de produire de la chitinase, à savoir la P8, P11, P36, P37, P41, P44, P48, P61, P62, P64, P66, et P68. La souche P69 est la meilleure souche avec une zone de dégradation de 23mm, P25, P29, P50, sont considérées comme fortement actives et P31 et P71 comme faiblement actives.

Enfin pour la production de la lipase, 22 souches de *Bacillus* ont produit cette enzyme par contre 18 sur 31 souches de *Pseudomonas* (Tableau 45 et Figure 38).

Tableau 45: Récapitulatif des tests de production des enzymes dégradant la paroi cellulaire.

Activités	Cellulase	Amylase	Caséinase	Gélatinase	Lipase	Chitinase
Bacillus	28/35	35/35	34/35	24/35	22/35	30/35
Pseudomonas	19/31	24/31	26/31	18/31	18/31	20/31

Le parasitisme et/ou la lyse des champignons par les bactéries de la rhizosphère est facilitée par la production d'enzymes hydrolytiques, qui dégradent les parois des cellules fongiques (CWDE:cell wall degrading enzymes). Nos résultats, ont montré que la majorité des souches de *Pseudomonas* et *Bacillus* sélectionnées a montré l'activité de l'amylase et de la protéase prononcée comparativement à d'autres métabolites. La protéase est connue pour ces interférences dans la dégradation de la paroi du pathogène fongique (Ahmadzadeh et Sharifi Tehrani-2009). Préalablement, Naik et Sakyhivel, (2006) ont déduit que les *Pseudomonas* produiraient d'autres types d'enzymes lytiques en l'occurrence des protéases, c'est ainsi que la souche PUP6 a produit des protéases ayant une activité antifongique CWDE.

Les souches de *Bacillus* sont aussi fortement productrices de cellulase comparativement aux souches de *Pseudomonas* (Karimi1 et al, 2012). Les résultats in vitro ont illustré que tous les isolats de *B. subtilis* (B108), produisent des métabolites extracellulaires plus que les *Pseudomonas* et inhibent la croissance des pathogènes. Ces

résultats sont en accord avec les recherches précédemment effectuées par Romanenko et al (2000) et Kamal et al (2009).

Les deux groupes des bactéries sont fortement productrices de chitinase surtout les espèces de *Bacillus*. Les chitinases et la cellulase, sont des enzymes hydrolytiques d'importance majeure, puisque la chitine (polymère linéaire de β -(1,4)- *N*-acétylglucosamine) est le constituant majeur de la majorité des parois cellulaires des champignons phytopathogènes (Kishore *et al.*, 2005). L'activité chitinolytique de *Pseudomonas* spp. souche PUP6 (Naik et Sakthivel, 2006), et des souches de *Pseudomonas* spp. (Verma *et al.*, 2007) a été rapportée comme activité antifongique. Des chitinases purifiées de *Bacillus subtilis* AF1 (Manjula et al., 2004), *Serratia marcescens* (Kishore *et al.*, 2005), *Serratia plymuthica* (Frankowski *et al.*, 2001) sont hautement antifongiques.

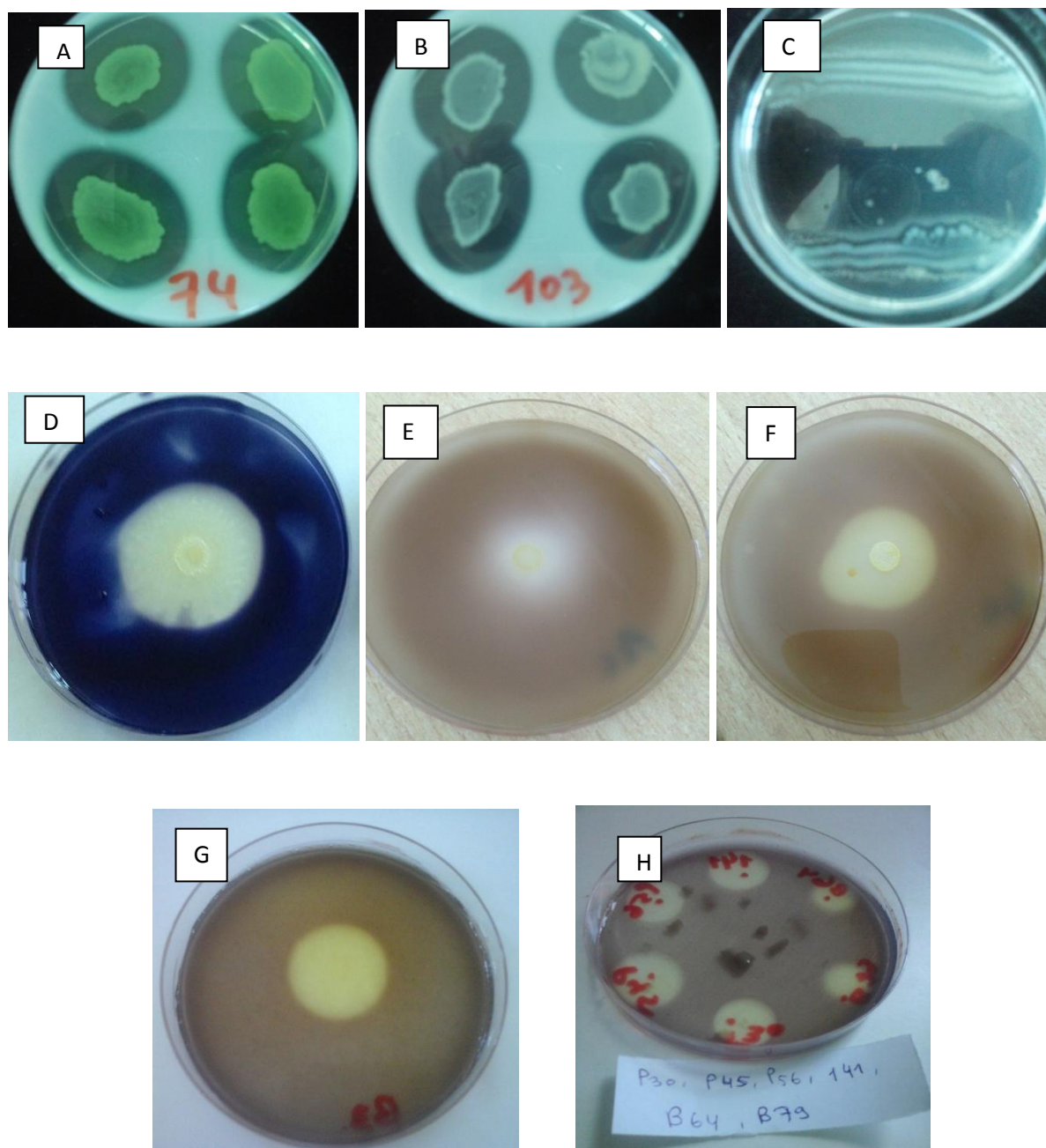


Figure 38: Exemples de résultats de tests enzymatiques ; A) Caséinase par *P.aeruginosa* ; B) Caséinase par *Bacillus* ; C) Lipase ; D) Amylase ; E) Cellulase par *P.aeruginosa* ; F) Cellulase par *B. laterosporus* ; G) Chitinase par B3 et H) Chitinase par des *Pseudomonas* et *Bacillus*.

V.3.2.Synthèse des sidérophores

Sur les milieux solides, la capacité de production des sidérophores est révélée par un halo qui va du jaune à l'orange autour de la colonie après 24h d'incubation à 28°C. En effet, sur les 35 souches de *Bacillus* testées, 22 souches étaient capables de produire un halo orange autour de la colonie dont le diamètre est égal de 2mm. Le reste des souches se sont avérées incapables de produire des sidérophores. Par ailleurs, la souche de *Bacillus* B65 s'est montré la meilleure souche produisant les sidérophores avec un diamètre de 4mm.

Dans le cas de *Pseudomonas*, sur les 31 souches testées, 28 souches sont capables de produire un halo orange autour de la colonie ou la P66 est la meilleure souche produisant les sidérophores avec 6mm de diamètre. P5, P44 et P71 sont les souches non productrices des sidérophores (Figure 39).

D'une manière générale, les espèces affiliées au groupe des *Pseudomonas* ont montré une forte production comparativement aux espèces de genre *Bacillus* (Fig). Les résultats obtenus nous donnent que la plupart des souches étudiées peuvent synthétiser des sidérophores sur le milieu de KB. La production maximale des sidérophores a été observé chez les isolats de *Pseudomonas* (*P. fluorescens* et *P.aeruginosa*). Ces résultats sont en concorde avec ceux de Gupta et al (2008). La capacité des bactéries antagonistes pour produire sidérophores a été fréquemment rencontrée chez les *Pseudomonas* isolées. Les souches de *Bacillus* sont aussi productrices de sidérophores mais avec des quantités faibles par rapport aux *Pseudomonas*. Ces résultats sont en concorde avec les travaux de (Cherif, 2014). Les pyoverdines produites par les espèces de *Pseudomonas* contiennent deux groupes fonctionnels (Hydroxamate et Catécholate).

Il existe d'autres types de sidérophores non fluorescents, et qui jouent un rôle dans la survie des bactéries (Meyer et Hornsperger, 1978; Meyer et Stintzi, 1998). Les hydroxamates sont produits aussi bien par les bactéries que par les champignons, alors que les catécholates sont exclusivement produits par les bactéries, et comprennent deux groupements l'un catéchol et l'autre hydroxyle ayant une fonction de ligand, la plupart des isolats produisent des hydroxamates révélés sur milieu CAS (Schwyn et Neilands, 1987). Bien que, les champignons phytopathogènes synthétisent également des sidérophores, ceux-ci ont généralement une plus faible affinité pour le fer par rapport à ceux produits par les PGPR (Schipper *et al.*, 1987).

Les microorganismes ont la capacité de synthétiser des composés s'appropriant les ions ferriques présents dans la rhizosphère et les rendent ainsi indisponibles pour le

champignon pathogène entraînant une diminution de sa croissance. Bien que le fer soit l'un des minéraux les plus abondants sur terre, dans le sol, il est indisponible pour l'assimilation directe par les microorganismes car l'ion ferrique (Fe^{+3}), la forme prédominante dans la nature, est peu soluble (Neilands *et al.*, 1987). La synthèse de sidérophores n'a été révélée que dans le milieu KB, considérés comme déficients en fer, à travers la production d'un pigment fluorescent diffusible dans le milieu. Le milieu King B est considéré comme sélectif pour les *Pseudomonas* spp. fluorescents (King *et al.*, 1954).

V.3.3. Production de l'acide-indole-acétique

L'estimation qualitative de la production de l'acide indole acétique et/ou de ses composés apparentés a été observée chez la plupart des souches testées (Figure 40). Pour les isolats de genre *Bacillus*, sur les 35 souches étudiées, 9 souches n'ont pas produits de l'AIA (B3, B13, B14, B27, B47, B71, B76, B78). Alors que la production du reste des souches varie de 20,90 à 55.30 $\mu\text{g/ml}$. Certaines souches à savoir B22, B40, B41, B73, ont montré un degré de production très appréciable en présence de tryptophane.

Chez les souches de *Pseudomonas*, nous avons observé que la plupart des souches avaient la capacité de synthétiser l'AIA en présence de tryptophane, uniquement trois souches n'ont pas réussi à le produire à savoir P33, P50, P59 (Tableau 46). Les souches productrices de ces métabolites ont développé une coloration rose à la suite de l'addition du réactif révélateur (de Salkowski) après 20mn d'incubation et la concentration de l'AIA varie de 19,40 à 134,40 $\mu\text{g/ml}$. Certaines souches étaient fortement productrices de l'AIA telles que la P36, P41, P43, P65, P71 (Tableau 46).

Tableau 46: Evaluation de la production qualitative et quantitative de l'AIA en présence de L-tryptophane (5mMol/l) à 535nm.

Bacillus	qualitatif	AIA µg/ml	Pseudomonas	qualitatif	AIA µg/ml
B22	+++	55,30	P29	++++	29,30
B39	+	32,50	P33	-	nd
B40	+	40,20	P36	++	78,50
B41	+	40,40	P37	++++	36,40
B42	+	Nd	P39	+	nd
B45	+	Nd	P41	++++	96,90
B47	-	Nd	P43	+++	132,30
B48	+	Nd	P48	++++	42,20
B53	++	Nd	P50	-	nd
B54	+++	20,90	P53	+	57,90
B58	+	nd	P56	++	42,90
B59	+	36,20	P59	-	nd
B61	+	38,10	P61	++++	59,10
B62	+++	33,40	P62	++++	54,70
B63		28,20	P65	+++	81,40
B64	+++	38,80	P66	+++	19,40
B65	+	nd	P45	+++	nd
B69	+	nd	P68	++	nd
B70	+	nd	P69	++++	51,40
B71	-	nd	P70	+++	20,90
B73	+	40,50	P71	++++	134,40

Nd= non déterminé.

Il existe cinq catégories de régulateurs de la croissance végétale : les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'éthylène et l'acide abscissique (Zahir *et al.*, 2004). L'AIA est le plus important du groupe des auxines (Ashrafuzzaman *et al.*, 2009) et quantitativement le plus produit par les PGPR. Il fonctionne comme une molécule signal importante dans la régulation du développement des plantes, agissant sur l'organogenèse, les réponses trophiques, les réponses cellulaires telles que l'expansion des cellules, la division, la différenciation et la régulation des gènes (Ryu et Patten, 2008).

La production qualitative de l'acide indole acétique et/ou de ses composés apparentés a été observée chez la plupart des isolats testés en présence de tryptophane, ces résultats sont en accord avec Kirimi, 2012 ; où La production d'acide indole-acétique a été montré par tous les isolats en présence ou en absence de tryptophane chez les souches de *Pseudomonas*. Le *Pseudomonas* isolé avait montré un niveau élevé de production d'acide acétique indole comparativement à *Bacillus* isolé. Xie et al. (1996) ont indiqué que, par rapport à d'autres souches, les souches de *Pseudomonas* avaient des niveaux plus élevés de production IAA.

Les espèces de *Bacillus* sont faiblement productrices de l'AIA nos résultats en accorde avec (Loper et Schroth, 1986) les bactéries à Gram positif sont faiblement productrices. Selon Joseph et al. (2007), tout en travaillant avec les pois chiches, les isolats de *Bacillus* ont produit l'IAA et ont ainsi amélioré la production et le rendement. De même d'autres microorganismes produisent une forte concentration d'auxine, ce qui contribue à augmenter la croissance des plantes et le rendement des cultures de blé (Tsavkelova et al., 2007).

Nos résultats ont montré qu'en ajoutant le tryptophane, la production d'acide indole acétique a augmenté, ce qui est similaire aux résultats obtenus par Ali et al (2009). Il est possible de suggérer que le tryptophane a agi comme un précurseur et donc conduit à la présence de ce matériau dans la rhizosphère par exsudats de plantes (Kamilova et al., 2006).

Les rhizobactéries peuvent convertir le tryptophane en acide indole acétique résultant dans l'augmentation de la croissance des plantes. Selon Mirza *et al.* (2001) In Mishra *et al.* (2010) la production de cette hormone est influencée par les conditions de culture, le stade de croissance et par la disponibilité du substrat dans le milieu.

L'absence de production chez certaines souches de *Bacillus* (B3, B13, B14, B27, B47, B71, B76, B78, P33, P50, P59) serait liée à la perte de l'appareil génétique et physiologique de la biosynthèse. Nos observations sont en accord avec celles de Naik et Sakthivel (2006), qui avaient suggéré l'induction de la production d'AIA en phase stationnaire de croissance, probablement due à l'induction d'enzymes clé impliquées dans la biosynthèse d'AIA (Oberhansli *et al.*, 1991; Garcia de Salmone *et al.*, 2001).

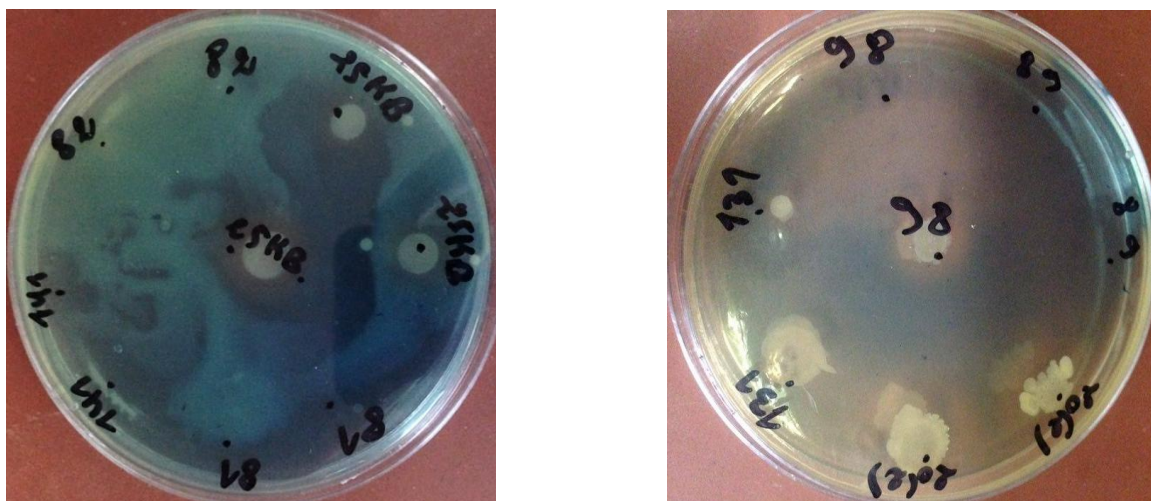


Figure 39 : Production des sidérophores par les souches bactériennes sur le milieu CAS-O.

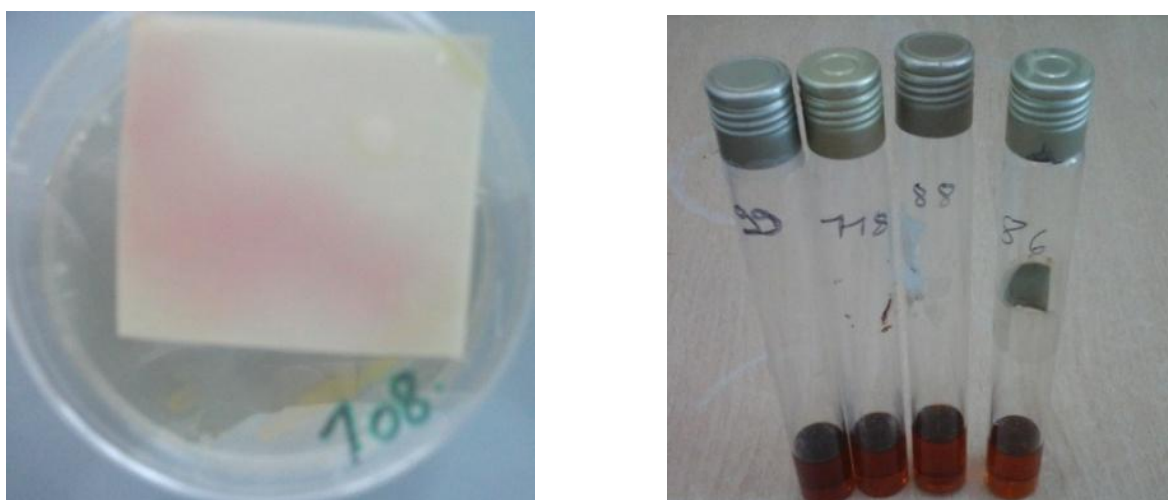


Figure 40 : Production de l'AIA en présence de L-tryptophane par les souches bactériennes.

V.3.4. Production des métabolites volatiles

V.3.4.1. La production de l'HCN

La production qualitative de l'acide cyanhydrique a été observée chez la plupart des souches testées (Figure 41). Sur les 31 souches de *Pseudomonas* sélectionnées, uniquement 3 souches n'ont pas produit de l'HCN à savoir la P48, P57 et la P62, alors que dans le cas des souches des *Bacillus*, seulement étaient non productrices de l'HCN à savoir la B61 et B69.

La quantification par spectrophotométrie de l'HCN produit a révélée que la densité optique varie de 0.050 à 0,208 avec les souches *Bacillus* dont certaines ont montré un degré de production très appréciable le cas de B46, B59, et B63. Mais tout ceci, reste très inférieure comparativement aux souches *Pseudomonas*, dont la plupart avaient synthétisé l'HCN en grande quantité où la DO variait de 0,044 à 0,225, particulièrement chez la P41, P53, P70 et P71 (Tableau 47).

Tableau 47 : Evaluation de la production qualitative et quantitative de l'HCN à 625 nm

Bacillus	Qualitative	DO à 625 nm	Pseudomonas	Qualitative	DO à 625 nm
B22	++	nd	P29	+++	0,177
B39	++	0.076	P31	+++	0,186
B40	++	0.050	P36	++	nd
B41	++	0.060	P39	+	0,191
B42	++	nd	P41	++	0,204
B45	++	nd	P43	++	0,044
B46	++	0,208	P44	++	Nd
B53	++	nd	P48	-	Nd
B54	+	nd	P50	+	Nd
B58	+	nd	P53	+	0,225
B59	++	0.206	P56	++	Nd
B61	-	0.072	P64	-	0,145
B63	+	0.165	P65	++	0,165
B72	+	nd	P66	++	0,189
B73	+	0.116	P70	++	0,208
B79	-	nd	P71	+	0,206

Nd : non déterminée.

V.3.4.2. Production de l'ammoniac NH₃

La production qualitative de l'ammoniac a été observée chez la plupart des souches testées (Figure 42). Sur les 31 souches de *Pseudomonas* sélectionnées on a 8 souches non productrices de l'NH₃ en l'occurrence la P31, P36, P37, P41, P44, P57, P64 et la P71 ; alors

que 11 souches de *Bacillus* n'avaient pas la faculté de produire l' NH_3 à savoir, la B22, B27, B39, B41, B46, B48, B64, B65, B69 et la B72.

Les résultats nous montrent qu'une seule souche de *Bacillus* (B62) a produit de l'ammoniac en grande quantité est (+++) et deux souches (B76 et B77) ont une production moyenne (++) . 17 souches sont faiblement productrices de l' NH_3 . Dans le cas des souches de *Pseudomonas*, deux isolats P29 et P30 se sont montrées fortement productrices de l' NH_3 ; huit souches ont une production moyenne (P5, P78, P39, P48, P53, P56, P59, P65) et enfin 12 souches sont faiblement productrices de l' NH_3 . Il en ressort que les souches de *Pseudomonas* sont fortement producteurs de l'ammoniac par rapport aux souches de *Bacillus*.

L'acide cyanhydrique est un métabolite secondaire dont la glycine est le précurseur. Bien que le cyanure soit un inhibiteur métabolique général, il est synthétisé, excrété et métabolisé par certains microorganismes, y compris les bactéries par la voie de décarboxylation oxydative en utilisant la glycine, le glutamate ou la méthionine comme précurseurs, dont les bactéries comme un moyen d'éviter la prédation ou la compétition.

L'HCN joue un rôle dans la lutte biologique contre les mauvaises herbes (Heydari *et al.*, 2008). Les plantes hôtes ne sont généralement pas affectées par le cyanure bactérien (Zeller *et al.*, 2007). Nos résultats corroborent avec ceux de Charest *et al.*, (2005) et Ahmad *et al.*, (2008) où la production de HCN par les isolats de *Pseudomonas* est plus forte par rapport aux isolats de *Bacillus*. La production de l'HCN est une activité très commune chez *Pseudomonas* (88,89%) et *Bacillus* (50%) dans le sol rhizosphériques.

D'autres composés volatiles, le 2,3-butanediol et l'acétoïne libérés par des PGPR entraînent une amélioration appréciable de la croissance de la plante en induisant sa résistance aux maladies (Ryu *et al.*, 2003). Les substances volatiles sont également impliquées dans la suppression de différents agents pathogènes. Howell *et al.* (1988) ont remarqué l'inhibition de *Pythium* par *Enterobacter cloacae* dans des boîtes de pétri cloisonnées et ont suspecté l'implication de substances volatiles.

La production de NH_3 est fréquente chez les souches étudiées, ce qui est comparable à ceux mentionnés dans plusieurs travaux dont Joseph *et al.*(2007) et Ahmed *et al.* (2008). L'ammoniac est identifié comme un agent inhibiteur, il joue le jeu d'un intermédiaire du catabolisme des acides aminés des exsudats racinaires assimilés par la bactérie.

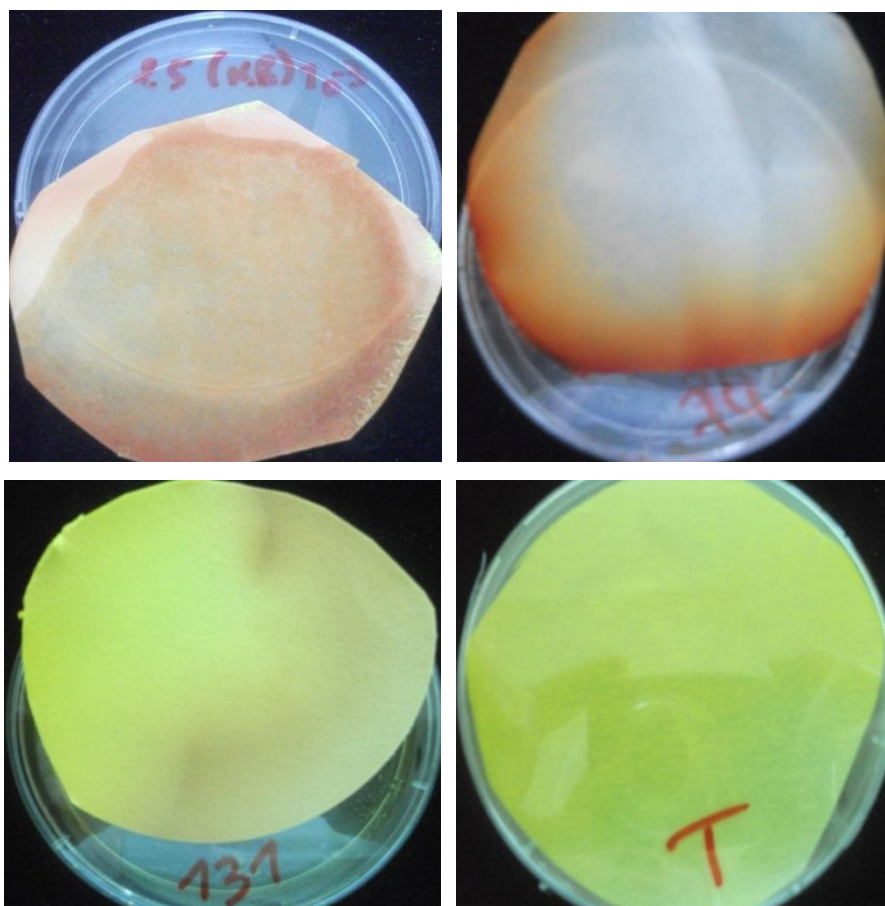


Figure 41: Production de L'HCN par les isolats de Bacillus et de Pseudomonas. (25kb10³, *P. fluorescens*) ; (74, *P. aeruginosa*) ; (131) *B. licheniformis* ; (T, témoin).



Figure 42: Production de l'ammoniac par les isolats bactériens rencontrés.

V.5. Conclusion

Nous avons montré dans cette étude les potentialités de production de métabolites secondaires chez 66 souches de *Bacillus* et *Pseudomonas*. La capacité de solubilisation des phosphates est retrouvée chez quelques souches et on trouve que les milieux liquides offrent la meilleure détection de la solubilisation du PTC que les milieux solides. Ces caractéristiques, en plus de ceux citées, pourraient avantager la souche dans sa compétition et son adaptation à divers écosystèmes.

La majorité des souches de *Pseudomonas* et *Bacillus* sélectionnées a montré la faculté de produire de l'amylase, la chitinase, la cellulase et de la protéase plus prononcée comparativement à d'autres métabolites. Concernant la cyanogénèse, les espèces de *Pseudomonas* on trouve que la plupart des isolats ont la capacité de synthétiser l'HCN en grande quantité. La capacité des bactéries antagonistes pour produire sidérophores a été largement distribuée entre *Pseudomonas* isolées. Les isolats de *Bacillus* sont aussi des producteurs de sidérophores avec des quantités faibles par rapport aux *Pseudomonas*. La production de NH₃ est très fréquente chez les souches isolées.

Conclusion générale

Conclusion générale

la culture de pois chiche en Algérie a connu une nette évolution durant la dernière décennie, en matière des superficies emblavées qui étaient de l'ordre de 33295ha et une production de 35118q et un rendement national moyen de l'ordre de 10,5 q/ha, données de la campagne agricole 2013-2014. Les agricultures se rendent compte, de plus en plus, du rôle appréciable que jouent les légumineuses à graines dans la fertilisation organique de sol. Le pois chiche peut fixer, par voie systémique, plus de 140Kg/ha d'azote atmosphérique et satisfaire plus de 80% de ses besoins en azote. Le pois chiche, au même titre que la fève et les haricots, est une graine protéagineuse cultivée pour sa richesse en protéine.

Cependant, cette culture est exposée aux infections naturelles pouvant conduire rapidement à la dégradation de la qualité sanitaire originelle. Parmi les pathogènes les plus redoutables et qui méritent donc une attention particulière, le flétrissement vasculaire du pois chiche, qui constitue une énorme contrainte pour la culture. Cette maladie est causée par un agent pathogène appelé *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris*. Elle constitue une menace autant plus grave que l'antracnose, pour la culture du pois chiche, en raison de son développement rapide et les dégâts qu'il occasionne.

Au terme de cette étude, les différents essais mis en place ont permis de dégager les constatations suivantes : le *Fusarium oxysporum* a été isolé à partir de différents fragments de tiges et de racines des plantes infectées. Ce constat, nous permet de conclure que le FOC responsable du flétrissement, est très répandu dans les principales aires de culture du pois chiche échantillonnées (Mascara, Sidi Bel Abbas, Ain Témouchent et Sétif).

Durant ce travail, nous avons pu isoler et caractériser, quatre isolats de l'agent pathogène, présentant une grande variabilité sur le plan pathogénicité que sur le plan de caractères biologiques. L'étude physiologique montre que le PDA, est le milieu le plus favorable pour la croissance du FOC et que la température de 25°C conjuguée à un pH 5, sont optimales pour la croissance de trois isolats (FOC1, FOC2, et le FOC4) et le pH de 6 pour le FOC3. En revanche, durée de période de luminosité ne constitue pas un facteur limitant pour le développement du FOC contrairement à certaines espèces très exigeantes à la lumière.

Par ailleurs, les tests de pathogénicité montrent qu'aussi bien les variétés de pois chiche testées et les isolats du FOC se sont comportés d'une manière assez variable les unes par rapport aux autres ; dénotant ainsi un effet variétal très prononcé. A la lumière des résultats obtenus, la **V5** s'est montrée très intéressante du point de vue résistance aux quatre isolats du FOC. D'où, son intégration parmi les mesures culturales de lutte intégrée contre cet

agent pathogène. En revanche, les **V2** et **V3** ont présenté des signes de sensibilité, ce qui nous pousse à conseiller leur utilisation que dans les sols indemnes du FOC.

Le contrôle biologique des maladies dues à des pathogènes du sol, à travers l'introduction de microorganismes bénéfiques dans la rhizosphère a été proposé comme une alternative à l'utilisation des substances chimiques. Certaines bactéries associées aux plantes particulièrement les *Bacillus* et les *Pseudomonas* ont fait l'objet d'explorations suppressives des maladies des cultures par antagonisme direct entre la bactérie et le phytopathogène du sol.

Dans cette stratégie, nous avons isolé 152 souches appartenant aux deux genres bactériens à partir la rhizosphère de la culture de pois chiche de plusieurs wilayas. Leur confrontation direct dans des tests in vitro afin d'évaluer leur pouvoir antagoniste vis-à-vis des isolats du FOC, a permis la sélection d'une vingtaine de souches très intéressantes du point de vue efficacité de l'inhibition de la croissance mycélienne des 4 isolats du FOC, donnant parfois un taux de 70% d'inhibition. Environ 43,42% des souches soit 66 sur 152 testées, avait montré une activité antagoniste importante contre le FOC et celle-ci augmente si la souche a la même origine agro-écologique que l'isolat fongique.

L'inhibition de la croissance mycélienne du FOC est le résultat de l'action combinée d'un certains nombre de composés diffusibles et volatiles. En effet, nos résultats montrent que l'action par les produits diffusibles dans le milieu de culture est très proche entre le groupe des *Bacillus* et des *Pseudomonas* et les espèces apparentées. En revanche, l'action par les produits volatiles des souches de *Bacillus* est plus prononcée que celle obtenue avec les souches de *Pseudomonas*. En outre, la sensibilité des isolats du FOC aux différentes substances produites par les bactéries, est à l'avantage des produits volatiles. La réduction de la croissance mycélienne par les rhizobactéries à travers la formation de zones d'inhibition autour des colonies fongiques est du vraisemblablement aux métabolites, aux substances antifongiques et ou aux enzymes dégradant la paroi cellulaire, libérées par les bactéries dans le milieu de culture. L'exploitation de la faculté antagoniste des *Bacillus* et des *Pseudomonas* dans le biocontrôle de la fusariose de pois chiche semble être très prometteuse.

A travers des tests d'identification standardisés, nous avons pu mettre en évidence l'existence de cinq espèces affiliées aux *Pseudomonas* et neuf espèces au groupe des *Bacillus* et *Pseudomonas* sont extrêmement variables. Le groupe des *Bacillus* renferme, *B.subtilis*, *B.lentus*, *B.licheniformis*, *B.circulans*, *B.cereus*, *B.firmus*, *B.amyloliquefaciens* et aussi *Aneurinibacillus aneurinilyticus* et *Brevisbacillus laterosporus*. Alors que le groupe des

Pseudomonas, comprend *P.luteolla*, *P.aeruginosa*, *P.fluorescens* et également *Sentrophomonas maltophilia* et *Sphingomonas paucimobilis*.

Les différentes analyses effectuées montrent que l'action antagoniste des souches bactériennes, est le fruit de la production de divers métabolites secondaires le cas des sidérophores, HCN, phosphatase, AIA, et enzymes extracellulaires tels que la chitinase, la cellulase, l'amylase et la protéase. Si la cyanogénèse, elle est au profit des *Pseudomonas* du moment que la majorité des souches étaient capables de synthétiser l'HCN en grande quantité. En revanche, la production des sidérophores n'a pas montré de différence significative entre les deux groupes d'espèces, le cas aussi de la production du NH₃ et de la solubilisation des phosphates. Tout en signalant ici que les milieux liquides offrent la meilleure détection de la solubilisation du PTC que les milieux solides.

Les conclusions que nous pouvons tirer des essais *in planta* conduits dans un sol infecté artificiellement par le FOC1 et le FOC2, que les données peuvent changer radicalement si on les compare avec les résultats des tests *in Vitro*. L'intégration de la variable plante hôte offre un autre facteur de ségrégation et ainsi, la sélection de souches performantes devient de plus en plus complexe. En effet, certaines souches ont pu gardées leur pouvoir protecteur vis-à-vis du FOC. Cette protection s'est traduite aussi bien par la stimulation de la germination et de la levée, la promotion de la croissance végétale, la réduction de l'infection et de la sévérité des symptômes de la maladie. En général, ces performances de protection sont corrélées avec les performances métaboliques. Quand même on doit signaler, que certaines souches malgré leurs forts taux d'inhibition *in vitro*, ceci ne s'est pas traduit dans les tests *in planta*.

Perspectives de recherche et de développement

Les résultats préliminaires de cette étude, nous pousse à suggérer qu'un certain nombre de souches se sont montrées fort intéressantes, douées de facultés antagonistes et promotrices, pourraient trouver leurs places dans des applications biotechnologiques visant l'amélioration des rendements et la préservation de l'environnement.

Certes, l'antagonisme *in vitro* et *in planta* ne peuvent pas à eux seuls expliquer toutes les interactions bactéries antagonistes – champignons pathogènes et les performances enregistrées, et de les prendre ainsi comme critères fondamentaux de lutte et biocontrôle. Davantage d'investigations à travers d'autres tests aussi variés les uns que les autres s'imposent afin d'arriver à identifier les souches les plus performantes.

La caractérisation moléculaire des souches bactériennes, la recherche de souches et leur isolement à partir des zones fragiles (zones arides et semi-arides), l'étude du comportement et la viabilité des souches dans les habitats agricoles en compétition avec les composants biologiques, physicochimiques, constituent autant de sujets de recherche.

Aussi, un complément d'étude sur la stabilité et la reproductibilité des effets bénéfiques de ces rhizobactéries à l'échelle de pratiques agronomiques dans le terrain doit être pris en charge. Bien que des biopesticides à base de souches de *Bacillus* et *Pseudomonas* spp. fluorescents sont déjà commercialisés en Europe et en Amérique, leurs application à grande échelle n'est pas encore concrétisée. En outre, rien ne garantit que les souches développées ailleurs puissent reproduire les mêmes effets. Donc, l'identification de souches locales peut se targuer d'offrir plus de chances et avoir les clés de réussite.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- AAC (Agriculture et Agroalimentaire Canada). (2006).** Le Bulletin bimensuel ; Vol 17; 15; 4 pages. Pois chiche: Situation et perspectives
- Abdelgherfi L.M., Zine F., Bouzide L., Laib M. et Kadir A., (2000).** Caractérisation préliminaire de quelques cultivars locaux de cicer arietinum collectés dans la région de Tizi-ouzou. *Recherche agronomique.*, 7 : 51-65.
- Abou Assaf H., (2006).** Screening and identification of new biocontrol agents (BCAs) against grapevine powdery mildew. *Doctoral thesis*, Damascus University-Syria, 106p.
- Achouak, W., Conrod, S., Cohen, V., and Heulin, T., (2004).** Phenotypic variation of *Pseudomonas brassicacearum* as a plant root-colonization strategy. *Mol Plant Microbe Interact* 17: 872-879.
- Adam, A., (2008).** Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes. *Thèse de Doctorat*, Université de Liège, Belgique, 165p
- Adebayo, O.S., Ekpo, E.J.A., (2004).** Efficiency of fungal and bacterial biocontrol organisms for the control of fusarium wilt of tomato. *Nigerian Journal of Horticultural Sciences* 9: 63-68.
- Agrios G.N., (2005).** Plant pathology, 5^{ème} édition. Departement of Plant pathology University of Florida, Elsevier Academic Press.pp. 948.
- Ahimou, F. Jacques, P., Deleu, M. (2000).** Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme Microb. Technol.* 27 : 749– 754.
- Ahmad Z., Ghafoor A., Bashir M. (2006).** Effect of seed borne pathogens on seed longevity in chickpea and cowpea under storage at 25°C to -18°C. *Seed Sci. and Technol.* 3
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S., (2005).** Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turkish Journal of Biology* 29(1): 29-34.
- Ahmad, M.A., S.M. Iqbal, N. Ayub, Y. Ahmad and A. Akram, (2010).** Identification of resistant sources in chickpea against *Fusarium* wilt. *Pak. J. Bot.*, 42: 417-426.
- Ahmadzadeh, M., Tehrani, A. S. and Jahromi, K. T., (2004).** Study on production of some antimicrobial metabolites by fluorescent pseudomonads. *Iran. J. Agric. Sci.*, 35(3): 731-739.
- Ahmadzadeh, M., Tehrani, A.S., (2009).** Evaluation of fluorescent pseudomonads for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. *Biological Control* 48(2): 101–107.
- Ahmed, O.H., H. Aminuddin et M.H.A. Husni (2008).** Ammonia volatilization and ammonium accumulation from urea mixed with zeolite and triple superphosphate. *Acta Agric. Scand.*, 58: 182-186.
- Akhtar, M.S., Shakeel, U., Siddiqui, Z.A., (2010).** Biocontrol of *Fusarium* wilt by *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Rhizobium* sp. on lentil. *Turkish Journal of Biology* 34(1): 1-7.
- Ali, S.k.Z, V. Sandhya, M. Grover, N. Kishore, L.V. Rao, et B. Venkateswarlu. (2009).** *Pseudomonas* sp. strain AKM-P6 enhances tolerance of sorghum seedlings to elevated temperatures. *Biol. Fert. Soils.* 46: 45–55

- Alström, S., (1987).** Factors associated with detrimental effects of rhizobacteria on plant growth. *Plant and Soil* **102**(1): 3-9.
- Alvarez A.M. and Briner G.C, (1987).**, Root rot of chickpea caused by *Fusarium Solani*. *Agriculture Tachnica.*, **47** : 78- 79.
- Anith, K. N., Tilak, K. V. B. R. and Kanuja, S. P. S., (1999).** Molecular basis of antifungal toxin production by Fluorescent *Pseudomonas* sp. strain EM85-a biological control agent. *Curr. Sci.*, **77**: 671-677.
- Anjali Chauhan¹, Praveen P. Balgir² and C.K. Shirkot, (2014).** Characterization of *Aneurinibacillus aneurinilyticus* Strain CKMV1 as a Plant Growth Promoting Rhizobacteria, *IJAEB*: **7**(1): 37-45
- Anonyme (2005).**, **Profil du pois chiche au Canada, (2005).** Préparé par : Programme de réduction des risques liés aux pesticides, Centre pour la lutte antiparasitaire, Agriculture et Agroalimentaire Canada Pulse Canada www.pulsecanada.com, Chickpeas Market Information.
- Anonyme, (2003).** Bactériologie DCEM1, *Service de Bactériologie*. Université Paris-VI, Pierre et M. Curie, 77p.
- Anonyme, (2008).** LNPV, Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Directive générale mycologie (2008). Toutes céréales, détection et identification des espèces de *Fusarium* spp. Et microdochium nivale sur grains de cereales par isolement mycologique semi-selectif et etude microbiologique. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche de France. P11.
- Anonyme, (2009).** Introduction au travaille dans le labo de microbiologie. *Microbiologie*, 77p.http://mysite.science.uottawa.ca/jbasso/microlabo_09/exercices_09/Manuel_micro_2009.
- Anonymous (2004b).** Characteristics of powdery mildew. Cooperative reseach centre forviticuture.<http://www.dtfwid.qld.gov.au/>
- Anonymous (2004c).** Running towards resistance. CSIRO publications, Australia. <http://www.csiro.au/files/files/p2jb.pdf>
- Anonymous (2005).** Canada's bulletin on ecological pest management, biocontrol files. <http://www.biocontrol.ca/pdf/bio4.pdf>
- Antonio Ventosa, Joaquin, J. N ; and Aharon Oren, (1998).** Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol, **62** :(2). 504-544.
- Anuar, A.R., K.J. Goh, T.B. Heoh and O.H. Ahmed, (2008).** Spatial variability of soil inorganic N in a mature oil palm plantation in Sabah, Malaysia. *Am. J. Applied Sci.*, **5**: 1239-1246.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J.Y., Wakabayashi, H., and Oyaizu, H. (2000).** Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* **50** Pt 4: 1563-1589.
- Armstrong G.M. et Armstrong J. K., (1981).** Formae specialis and races in *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. Pages 391- 399 In: *Fusarium Diseases. Biology and Taxonomy*. Nalson P.E., Tousoon T.A. and cook R.J. eds Pennsylvania State University Park., 457pp.
- Asghar, H and Pessarakli, M., (2010).** A review obbiological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences*, **10**: 273-290

- Asghar, H., Z. Zahir, M. Arshad and A. Khaliq (2002).** Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biol. Fertil. Soils*, **35**: 231-237.
- Ashrafuzzaman, M., F.A. Hossen., M.R. Ismail., M.A. Hoque., M.Z. Islam ., S.M. Shahidullah and S. Meon (2009).** Efficiency of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *Afri. J. Biotechnol.*, **8** : 1247-1252.
- Athakorn Promwee, Montree Issarakraisila, Warin Intana, Chiradj Chamswang, and Punnawich Yenjit (2014).** Phosphate solubilization and growth promotion of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muel. Arg.) by *Trichoderma* Stains, *Journal of Agricultural Science* ;**6**, (9); ISSN 1916 -9752 E-ISSN. 1916- 9760.
- Athukorala, S.N., Fernando, W.G., Rashid, K.Y., (2009).** Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. *Canadian Journal of Microbiology* **55**(9): 1021-1032.
- Avril J. L., Dabrenat H., Denis F., Monteil H., (1992).** Chapitre *Bacillus* In: *Bactériologie Clinique* 2^{ème} édition, édition Markting. P: 135-149.
- Babar B. M., Shah T. M., Abbas G. and Ahsanul Haq M., (2009).** Genotype X environment interaction for seed yeild in Kabuli chickpea (*cicer arietinum* L.) genotypes developped trough mutation breeding *Pakistan Journal of Botany.*, **4** : 1883- 1890.
- Bacha F. and Ounane S.M., (2003).** Etude de l'effet du stress Hydrique sur les activités des enzymes nitrate réductase et nitrogénase de la culture du pois chiche (*Cicer arietinum* L.). *Institu National de la recherche agronomique d'Algérie.*, **13** : 1111- 1992.
- Bais, H.P., Fall, R., Vivanco, J.M. (2004).** Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilme formation and surfactin production. *Plant Physiol.* **134**: 307–319.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. and Vivanco, J.M., (2006).** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 233-66.
- Barazani, O. and Friedman, J., (1999).** Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *J. Chem. Ecol.* **25**:2397-2406.
- Barea, J.M., M.J. Pozo, R. Azcón et C. Azcón-Aguilar (2005).** Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.*, **56**: 1761-1778.
- Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Meyer, J-M and Spröer, C., (2007).** *Pseudomonas lurida* sp. nov., a fluorescent species associated with the phyllosphere of grasses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57** (5): 979-985.
- Bekkar A. A., (2007).** Variabilité de la morphologie et du pouvoir pathogène chez *fusarium oxysporum* schelcht.Emend. Snyd.Hans.f.sp.ciceri (Pawick), agent du flétrissement vasculaire du pois chiche (*Cicer arietinum*L.)
- Bell-Perkins, L. J., et J.M. Lynch. (2002).** Rhizosphere microbiology, p. 2713-2728. *In* G. Bitton (ed.), *Encyclopedia of environmental microbiology*, A Wiley-Interscience Publication, Canada.
- Benhammou, N., F.A. Bekkara., et T.K. Panovska., (2009).** Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *C. R. Chemie.* **12**: 1259- 1266

- Benzohra I. E., (2009).** Contribution à l'étude d'*Ascochyta rabiei* (Pass) Labr., agent causal de l'antracnose morphologique et étude du pouvoir pathogène. Thèse de Doctorat.
- Berber, I. and Yenidunya, E., (2005).** Identification of alkaliphilic *Bacillus* species isolated from Lake Van and its surroundings by computerized analysis of extracellular protein profiles. *Turk. J. Biol.*, **29**: 181-188.
- Blaise K., Couture L., Dostaler D., Berner L., (2001).** Variabilité phénétique du colletotrichum graminicola du Sorgho, *Can.J.Plant Patho.* 23.
- Blanca B. Landa , Ana Hervas, Wanger Bottol and Rafael M. Jiménez- Diaz,(1997).** Antagonistic activity of Bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris*. *Phytoparasitica* **25** (4) : 305- 318.
- Bloemberg, G.V. et B.J.J. Lugtenberg (2001).** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **4**:343-350.
- Bock.B., (2009).** *Cicer arietinum* L. tela Botanica, Base de données Nomenclature de la flore de France. BDNFV 4.02. [http:// WWW.tela- Botanica.org](http://WWW.tela-Botanica.org).
- Booth C., (1971).** The genus *Fusarium*. Common wealth Mycological Institute. Kew. Surrey, England., 237P.
- Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. and Gardan, L., (2000).** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .**20**: 51-63.
- Bouhadida,M. (2014).** Efficacité de la sélection assistée par marqueurs dans la détection de génotypes de pois chiche résistants aux principales maladies fongiques en Tunisie, Etablissement.
- Bouzerzour H., Abbas K., Benmahammed A., (2003).** Les céréales, les légumineuses alimentaires, les plantes fourrages et pastorales. Recueil des communications atelier N° 3 « biodiversité importante pour l'agriculture » MATE GEF/ RNUD Projet ALG/97/G31.PP.79.
- Bric, J. M., Bostock, R. M. and Silverstone, S. E., (1991).** Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 535–538.
- Brock, TD, MT. Madigan, JM. Martinko et J. Parker (1994).** *Biology of Microorganisms*, 7th ed. Prentice Hall, NJ, USA.
- Cabrera de la Colina J., Trapero. Casas A. and Jimenez-Diaz R.M., (1985).** Races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* in Andalusia, Southern Spain. *International chickpea News letter.*, **13**:34-26.
- Campbell, J.I.A., Jacobsen, C.S. and Sorensen, J., (1995).** Species variation and plasmid incidence among fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from agricultural and industrial soils. *FEMS. Microbiol. Ecol.* **18**: 51-62.
- Cappuccino, J. C. et N. Sherman (1992).** *Microbiology: A Laboratory Manual*, third ed. Benjamin/cummings Pub. Co., New York, pp. 125-179.
- Carlile M.J.(1956).** a study of the factors influencing non- genetic variation in a strain of *Fusarium oxysporum*. *Journal of Genetics and Microbiology.*, **14** : 643-654.
- Castellanos, J.Z., J.X. Uvalle and A. Aguilar, (2000).** *Soil and Water Analysis Interpretation Manual*. 2 Edn., INCAPA, Mexico, pp: 226.

- Cattelan, A. J., P.G. Hartel et J.J. Fuhrmann.(1999).** Screening for plant growth-promoting hizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **63**:1670-1680.
- Chaiharn, M., et S. Lumyong (2009).** Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **25**: 305-314.
- Chakraborty *et al.*, 2005).
- Chandel, S.; Allan, E.J.; Woodward, S. (2010).** Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici* on tomato by *Brevibacillus brevis*. *J. Phytopathol.* **158** : 470-478.
- Chandrashekar. G (2015),** Global Chickpea Outlook, World Plus EConvention Las Vegas. USA.
- Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E., Lumyong, S., (2002).** Characterization of protease of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northen Thailand. *ScienceAsia* **28**(3): 241-245.
- Charest, M.H., C.J. Beauchamp et H. Antoun (2005).** Effects of the humic substances of de-inking paper sludge on the antagonism between two compost bacteria and *Pythium ultimum*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **52**: 219–227.
- Chen C.Y., Wang Y.H. and Huang C.J.,(2004).** Enhancement of the antifungal activity of *Bacillus subtilis* F29-3 by the chitinase encoded by *Bacillus circulans* chi A gene. *Canadian Journal of Microbiology.*, **50** :451-454.
- Chen, X., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mogel, G., Kunz, S., Borriss, R., (2009).** Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* dare efficient in controlling fire blight disease. *Journal of Biotechnology* **140** (1-2): 38-44.
- Cherif H., (2014).** Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. et *Pantoea agglomerans* isolées de sols (Thèse Doctorat), aridesUniversité Ferhat Abbas Sétif.
- Chérif M., Arfaoui and Rhaim A., (2007).** Phenolic compounds and their rol in bio-control and resistance of chickpea to fungal pathogenic attacks. *Tunisian Journal of plant protection.*, **2** :7- 12.
- Chernin, L., Ismailov, Z., Haran, S., and Chet, I.(1995).** Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1720–1726
- Cherrab M. (1989).** Contribution à l'étude morphologique et biochimique de quelques forms specials *F.oxysporum*. Thèse de Doctorat 3^{ème} cycle, Université Cadi Ayad, Merrakech Maroc., 104p.
- Chet I., Inbar J. (1994).** Biological control of fungal pathogens. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **48** (1): 37–43.
- Choudhary D.K., Johri B.N. (2009).** Interactions of *Bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiol. Res.* **164** (5): 493–513.
- Chung, H. K., Park, M. S., Madhaiyan, M., Seshadri, S., Song, J. K., Cho, H. S. and Sa, T. M.,(2005).** Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plant of Korea. *Soil Biol. Biochem.*, **37** (10) : 1970-1974.

- Claus, D. and Berkeley, R. C. W., (1986).** Genus *Bacillus* Cohn 1872. pp: 1105–1139. In: Murray, E. G. D.; Sneath, N. R.; Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (Editors), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9th ed., vol. 2. The Williams & Wilkins Company, Baltimore*
- Clays-Josserand, A., Lemanceau, P., Philippot, L. and Lensi, R., (1995).** Influence of two plant species (flax and tomato) on the distribution of nitrogen dissimilative abilities within fluorescent *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1745-1749.
- Collins D. P. and Jacobsen B.J.,(2003).** Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. *Biology and control.*, **26** (2):153- 161.
- Compant, S., S. Duffy, J. Nowak, C. Clement et E.A. Barka (2005).** Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principales, mechanisms of action, and and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(9):4951-4959.
- Cook, R. J., Brucart, W. L., Coulson, J. R., Goettel, M. S., Humber, R. A., Lumsden, R. D., Maddox, J. V., McManus, M. L., Moore, L., Meyer, S. F., Quimby, P. C., Stack, J. P., and Vaughn, J. L. (1996).** Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: Framework for scientific evaluation. *Biol. Control* **7**:333-351.
- Corbett, J. R., (1974).** Pesticide design. In : *The Biochemical Mode Action Pesticides* Academic Press, Inc., London, pp. 44-86.
- Daniels, R. Vanderleyden, J., Michiels, J. (2004).** Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 261–289.
- Davies .G., Greenr.H., Kellyd . R., Ro-Bertss . M. (1990).** Recent advances in the generation of chiral intermediates using enzymes, *Crit. Rev. Biotechnol.* **10**,129-152.
- DE LEY, J. (1992).** The Proteobacteria: Ribosomal RNA Cistron Similarities And Bacterial Taxonomy, In: *The Prokaryotes - A Handbook On The Biology Of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications* (Balowsa., , Truper, H.-G., Dworkinm, ., Harderw, ., Schleiferk., -H., Eds.) 2nd Ed., Pp. 2111-2140, New York: Springe
- Defago, G., Berling, C. H., Borger, U., Keel, C. and Voisard, C., (1990).** Suppression of black rot of tobacco by a *Pseudomonas* strain : Potential applications and mechanisms. In : *Biological Control Soil Borne Plant Pathogens*. Eds. D. Hornby, R. J. Cook and Y. Henis, CAB International, pp. 93-108.
- Demoz B.T., Korsten L. (2006).** *Bacillus subtilis* attachment, colonization, and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogens. *Biol. Control* **37** (1): 68–74.
- Di Pietro, A., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., Roncero, M.I.G., (2003).** *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molec. Plant Pathol.* **4** :315 – 325.
- Dileep Kumar B.S. (1999).** Fusarial wilt suppression and crop improvement through two rhizobacterial strains in chickpea growing in soils infested with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Biol. Fert. Soils* **29** (1): 87–91.
- Dileep Kumar BS (1999).** Fusarial wilt supression and crop improvement through two rhizobacteaia strains in chickpea growing in soils infested with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Biology and Fertility of Soil* **29**: 87-91.
- Di-Pietro A., Garcia- Maceira F. L., Huertas- Gonzalez D., ruiz- Roldan M.c., Carcuel Z., Barbieri A.S. and Roncero I.G., (1998).** Endopolygalacturonase PG1 in different formae

speciales of *Fusarium oxysporum*. Applied and environmental microbiology., **64** : 1967-1971.

Domsch, K.H., W. Gams and T.H. Anderson, (1993). Compendium of Soil Fungi. 2nd Edn., Verlag, London, ISBN: 3930167697, pp: 672.

Dueñas, G.J.M., T. Shagarodsky, J.A. Fresneda, Y. Hernandez and J. Gonzalez, (2003). Characterization of *Fusarium* species associated with chickpea (*Cicer arietinum*) crops in Habana City provinces and La Habana. Sci. Technol. Topics, **11**: 63-66.

Ekundayo, E.A., Adetuyi, F.C., Ekundayo, F.O., (2011). In vitro antifungal activities of Bacteria associated with maize husks and cobs. *Research Journal of Microbiology* **6**(4): 418-424.

El Amraoui B., El Amraoui M., Cohen N. & Fassouane A. (2013), Biocontrôle De la fusariose vasculaire du melon par des microorganismes marins, *Revue Marocaine de Protection des Plantes*, N° 4: 15-25.

El Aoufir A. (2001). Étude du Flétrissement Vasculaire du Pois Chiche (*Cicer arietinum*) Causé par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. Evaluation de la Fiabilité de L'analyse Isoenzymatique et de la Compatibilité Végétative pour la Caractérisation des Races Physiologiques. Thèse de doctorat, Université Laval, Canada, 161 pp.

El Aoufir A. , (2001). Etude du flétrissement vasculaire du pois chiche (*Cicer arietinum*) cause par le *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, Evaluation de la fiabilité de l'analyse isoenzymatique et de la compatibilité végétative pour la caractérisation des races physiologiques. Thèse de Doctorat Université Laval, P161.

El Aoufri A.,(2001). Etude du flétrissement Vasculaire du pois chiche (*Cicer arietinum*) cause par le *Fusarium oxysporum* f ;sp. *Ciceri*. Evaluation de la fiabilité de l'analyse isoenzymatique et de la compatibilité végétative pour la caractérisation des races physiologiques, thèse de Doctorat, Université Laval, P 161.

El-Banna, A.A., Scott, P.M., Lau, P.Y., Sakuma, T., Platt, H.W. and Campbell, V., (1984). Formation of trichothecenes by *Fusarium solani* var. *coeruleum* and *Fusarium sambucinum* in Potatoes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**: 1169-1171.

El-hamshary, O. I. M. and Khattab, A. A.,(2008). Evaluation of Antimicrobial Activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* and Their Fusants Against *Fusarium solani*. *Res. J. of Cell and Mol. Biol.*, **2**(2): 24-29.

Erdogan O, Benlioglu K (2010). Biological control of Verticillium wilt on cotton by the use of fluorescent Pseudomonas spp. Under field conditions. *Biol control* **53**: 39-45.

Erler F., Ceylan F., Erdemir T., and Toker C., (2009). Preliminary results on evaluation of chickpea, *cicer arietinum* genotype for resistance to the pulse beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Insect science.*, **9** : 58-72

Euzeby, J.P.,(2008). List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. URL <http://www.bacterio.cict.fr/>.

FAO (2015). Food and agriculture organization of the united nations database. FAOSTAT agriculture. <http://faostat.fao.org/>

FAO, (2007). Food and agriculture organization of the united nations database. FAOSTAT agriculture. <http://faostat.fao.org/>

Farooq S. Iqbal S. H ; M. and Abdul Rauf C. H., (2005). Physiological studies of *Fusarium oxysporum* f.sp.*ciceris*. *international journal of agriculture and biology.* 257-277

- Fatima, Z., Saleemi, M., Zia, M., Sultan, T., Aslam, M., Rehman, R., Chaudhary, M.F., (2009).** Antifungal activity of plant growth-promoting rhizobacteria isolates against *Rhizoctonia solani*.
- Fernandes, P. A. V.; de Arruda, I. R.; dos Santos, A. F. A. B.; de Araújo, A. A.; Maior, A. M. S. and doXimenes, E. A., (2007).** Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. *Braz. J. of Microbiol.*, **38**: 704-709.
- Feuilloy, M.G.J., Chapalain, A., Rossignol, G., Lesouhaitier, O., Merieau, A., Geoffroy, V., Guerillon, J., Meyer, J.M., and Orange, N. (2007).** Comparative study of seven fluorescent pseudomonad clinical isolates. *Can J Microbiol* En révision. **4**:69-75.
- Fiddaman PJ, Rossall S (1993).** The production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 119-126.
- Fravel D. R. (2005).** Commercialization and Implementation of Biocontrol, *Annual Review of Phytopathology*, **43** :337-359.
- Fritze, D. (2004).** Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: The aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology* **94**:1245-1248.
- Front Matter (2001).** Benson: Microbiological Applications Lab Manual, Eighth Edition 151-165P. Frankowski, J., Lorito, M., Scala, F., Schnid, R., Berg, G. and Bahl, H., 2001. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Arch. Microbiol.* **176**: 421–426.
- Garbaye, J. (1994).** Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis (Tansley review, (76). *New Phytologist*, **128**: 197-210.
- Garbeva, P., J. A. van Veen, et J. D. van Elsas (2003).** Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE, *Microbiol. Ecol.* **45**:302–316.
- Garcia de Salmone, I. E., Hynes, R. K. and Nelson, L., (2001).** Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.* **47**: 404-411.
- Garrity, G. M.; Bell, J. A. and Lilburn, T. G., (2004).** Taxonomic Outline of the Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed.*, Release 5.0. ed. Springer-Verlag, New York, 401p.
- Gaur P.M. Pande S., Upadhyya H.D. and Rao B.V. (2008).** Extra- large Kabuli chickpea with high resistance to Fusarium Wilt. *International chickpea and pigeonpea Newsletter.*, **13** : 5-6.
- Gebring, P. J., Nolan, R. J. and Watanabe, P. G., (1993).** Solvents, fumigants and related compounds. In : *Handbook Pesticide Toxicology*, Volume 2, Eds. W. J. Hayes and E. R. Laws, Academic Press Inc., Sand Diego, California, pp. 646-649.
- Ginard, M., Lalucat, J., Tummler, B., and Romling, U. (1997).** Genome organization of *Pseudomonas stutzeri* and resulting taxonomic and evolutionary considerations. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 132-143.
- Glickmann, E. and Dessaux, Y., (1995).** A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 793-796.
- Gnanamanickam, R. Balasubramanian and N. Anand., (2005).** Chennai, pp. 26-30.

- Godinho, A., Ramesh, R., Bhosle, S., (2010).** Bacteria from sand dunes of Goa promoting growth in Eggplant. *World journal of Agricultural Science* **6**(5): 555-564.
- Golovleva, L.A., Maltseva, O.V. and Solyanikova, I.P.,(1992).** Metabolism of foreign compounds in *Pseudomonas* spp. In: *Pseudomonas*, Molecular Biology and Biotechnology (Galli, E., Silver, S., Witholt, B.,eds), Am. Soc. Microbiol, Washington, DC, pp. 231-238.
- Gopalakrishnan, S., Beale, M.H., Ward, J.L., Strange, R.N., (2005).** Chickpea wilt: identification and toxicity of 8-O-methyl-fusarubin from *Fusarium acutatum*. *Phytochemistry* **66**(13): 1536-1539.
- GOUNOTA, . M. (1991).** Bacterial life at low temperature: physiological aspects and biotechnological applications, *J. Appl. Bacteriol.* **71**:386-397.
- Gravel, V., Antoun, H. and Tweddell, R.J., (2007).** Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of Indole Acetic Acid (IAA). *Soil Biol. Biochem.* **39**: 1968-1977.
- Gray, E. J., et D.L. Smith. (2005).** Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signalling processes. *Soil Biol. Biochem.* **37**: 395- 412
- Grewal, J.S., Pal, Mahendra, (1970).** Fungal diseases of gram and arhar. Proc. IV Annual Workshop on Pulse Crops, PAU, Ludhiana, pp. 168.
- Groenewald, S., N.V.D. Berg, W.F.O. Marasas and A. Viljoen, (2006).** Biological, physiological and pathogenic variation in a genetically homogenous, population of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Australas. Plant Path.*, **35**: 401-409.
- Gupta O.M., Kotasthane S.R. and Khare M. M., (1986).** Fusarium Wilt of chickpea (*Cicer arietinum*). *Agricultural Review.*, **7** : 87-97.
- Gupta P.K. And Sharma P.C. (1991).** Cytogenetic and related aspects in some pulse crops. In: Tsuchiya, T. and Gupta, P.K. (eds) *Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution Part B.* Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, p. 31.
- Gupta, S.S. (2003).** Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**(3):219-227.
- Gyung-Hyun Y., Eun-Tag L. & Sang-Dal K. (2001).** Identification And Antifungal Antagonism Of *Chryseomonas luteola* 5042 against *Phytophthora capsici*. *Sanoeb Misaengmul Haghoeji*, **29** : 186-193.
- H. Kim, J. Park, S. Choi, K. Choi, G.P. Lee, S. J. Ban, H. C. Lee, and S. C. Kim,(2003).** Isolation and Characterization of *Bacillus* Strains for Biological Control,” *The Journal of Microbiology*, vol. **41**, no. 3, pp.196-201.
- Halila H.M. Grindley H. E. and Houdiard P., (1984).** Source of resistance to Fusarium Wilt in Kabuli Chickpeas. *International chickpea Newsletter.*, **10** : 13-14.
- Halila I., Cobas M. J., Ruubio J. and Milan,(2009).** Tagging and mapping a second resistance gene for Fusarium wilt race 0 in chickpea. *European Journal of Pathology.*, **124** : 87-92.
- Hanan Ibrahim Mudawi, Mohamed Osman Idris. (2014).** The efficacy of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* isolates in the control of chickpea wilt pathogens, *Agriculture, Forestry and Fisheries.* **3**(5): 346-351.

- Handelsman JO, Raffel S, Mester EH, Wunderlich L, Grau CR, (1990).** Biological control of damping-off of Alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. *App. Environ. Microbiol.*, **56**: 713–718.
- Harwood, C.R., Wipat, A. (1996).** Sequencing and functional analysis of the genome of *Bacillus subtilis* strain 168. *FEBS Letters*.**389**:84-87.
- Harwoodj. ,(1989).** The versatility of lipases for industrial uses, *Trends Biochem. Sci.* **14**: 125-126.
- Hashimoto, Hg.,O To,M ., Katayamca., Kitahata,S. (1991),** Purification and some properties of a-galactosidase from *Pseudomonasfluorescens* H- 601, *Agric. Biol. Chem.* **55**,2831-2838.
- Hawar M.P.(1988).** Fusarium Wilt and other important disease of chickpea in the mediterranean area. Proceedings of international worshop on present status and future prospect on chickpea crop production and in provement in the Mediterranean countries. CIHEAM/EEC, Agrimed/ ICARDA. 11-13, Zaragoza, Spain.
- Haware M. P. And Nene .Y.L. (1982).** Race of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* Plant Diseases.,**66**: 809-810.
- Haware M.P., and Nene Y.L.(1984).** The role of chickpea root exudates in resistance to Fusarium Wilt, *International Chickpea Newsletter* **10** : 12-13.
- Haware M.P., Nene Y.L. and Mathur S ; B., (1986).** Seed borne disease of chickpea. Technical Bulletin from the Danish government institue of seed Pathology for Developing countries, Copenhagen Denmark., **1** : 14.
- Heydari, S., P.R. Moghadam et S.M. Arab (2008).** Hydrogen Cyanide Production Ability by *Pseudomonas Fluorescence* Bacteria and their Inhibition Potential on Weed. *Proceedings "Competition for Resources in a Changing World: New Drive for Rural Development"*, Tropentag, Hohenheim.
- Hjeljord L. G., Stensvande A. and Transmo A.,(2000).** Effet of temperature and nutrient stress on the capacity of commercial Trichoderma product to control Botrytis cinerea and Mucor piriformus in greenhouse Strawberrie. *Biological control.*, **19** (2) : 149-160.
- Höfte, M., et N. Altier. 2010.** Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Res. Microbiol.* **161**: 464-471.
- Holloway, B. W., (1992).** *Pseudomonas* in the late twentieth century. In: *Pseudomonas, Molecular Biology and Biotechnology* (E Galli, S Silver, B Witholt,eds), Am Soc Microbiol, Washington, DC, 1-8.
- Holloway, B.W., Krishnapillai, V., and Morgan, A.F. (1979).** Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol. Rev.* **43**: 73-102.
- Howell, C. R., R. C. Beier et R. D. Stipanovic (1988).** Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* preemergence darnping-off by the bacterium. *Phytopathologia*, **78**:1075- 1078.
- Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A. and Métraux, J.P., (2003).** Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to rootinoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**:851–858
- IOOS R., (2001).** Comparaison de deux techniques de détection des *Fusarium* spp. sur grains de céréales et premières descriptions d'infections multiples par *Fusarium* spp. Et *Microdochium* sp. au niveau du grain. *Annales du 5e congrès de la S.F.P.*, Angers, mars

- Iruela M., Rubio J., Cubero J. I. and Millan T., G.,(2002).** Phylogenetics analysis in the genus cicer and cultivated chickpea using RADP and ISSR markers. *Theoretical Applied in genetics.*, **104** : 643-651.
- J.F. Leslie and B. A. Summerell. (2006).** *Fusarium laboratory manual*, 1st ed., Blackwell Publishing, Asia, pp. 387.
- J.R. Montealegre, R. Herrera, J.C. Velasquez, P. Silva, X. Besoain, and L.M. Perez, (2005).** Biocontrol of root and crown rot in tomatoes under greenhouse conditions using *Trichoderma harzianum* and *Paenibacillus lentimorbus*. Additional effect of solarization, *Electronic Biotech.*, **8**, pp. 249-257.
- Jalali B. L. and Chanda H.,(1992).** Chickpea wilt. In : *Plant Diseases of International Importance*. Vol. 1. Diseases of cereals and Pulses (eds Singh, U.S et al), Prentice Hall, N. J. PP. 420-444.
- Jayasuja, V. and Iyer, R., (2003).** Multiplication and translocations of introduced endophytic antagonistic bacterium (*Bacillus amyloliquefaciens*) in coconut seedlings. *6th Int. PGPR Workshop*, **5-**, Indian Institute of Spices Research, Calicut, India, pp. 33-37.
- Jemni Monia, Maaroufi Abderrazek, Mejri Slah (2010).** Caractérisation et optimisation des conditions de croissance d'un biopesticide bactérien, *Revue des Régions Arides – Numéro spécial – 24 (2/2010) Actes du 3ème Meeting International ‘‘Aridoculture et Cultures Oasisennes : Gestion et Valorisation des Ressources et Applications Biotechnologiques dans les Agrosystèmes Arides et Sahariens’’* Jerba (Tunisie). 15-16-17/12/2009.
- Jimenas-Gasco M. M., Navas- cortés, J.A., Rafael M., and Jimenz- Diaz R.M.(2004).** The *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*/ *Cicer areitinum* Pathosystem : a case study of the évolution of plant pathogène fungi into races and pathotypes. *International microbiology* **7** : 95-104.
- Jimenez-Gasco M.D.M., Milgromm M. G., and Jimenz- Diaz R.M. (2004).** Stepwise evolution of races in *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* inferred from fingerprinting with repetitive DNA sequences. *Phytopathology.*, **94** : 22_- 235.
- Jiménez-Gasco M.M., Navas-Cortés J.A., Jiménez-Díaz R.M. (2004).** The *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*/*Cicer arietinum* pathosystem: a case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. *Int. Microbiol.* **7 (2)**: 95–104.
- Joseph, P. J., Vrinda, T. S., Sivaprasad, P. and Heera, G., (2003).** Potential of fluorescent pseudomonads as component in integrated management of leaf rot of coconut. *Sixth Int. PGPR workshop*, 5-10 October, 2003, Indian Institute of Spices Research, Calicut, Kerala, India, pp. 37-43
- K. Karimi, J. Amini, B. Harighi, B. Bahramnejad (2012).** Evaluation of biocontrol potential of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. against *Fusarium* wilt of chickpea. *AJCS* **6(4)**:695-703.
- K. Saravanakumar, V. Shanmuga Arasu, K ; Kathiresan (2013).** Effet of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marura*, *aquatic Botany* **104**, 101-105.
- Kamal AM Abo-Elyousr, Hashem M Mohamed (2009).** Biological control of *Fusarium* wilt in tomato by plant growth-promoting yeasts and rhizobacteria. *Plant pathol. J* **25(2)**: 199-204.
- Kamel M. (1990).** Winter chickpea: status and prospects. *CIHEAM, Options Méditerranéennes, Séries Séminaires*, **9**, p145.

- Kamilova, F., Validov, S., Azarova, T., Mulders, I. and Lugtenberg, B., (2005).** Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ. Microbiol.* **7**: 1809-1817.
- Kassem Z., Lev-Yadun S., Goper A., Weinberg P. Et Abbo S. (2006).** Chickpea domestication in the Neolithic Levant through the nutritional perspective. *Journal of Archaeological Science*; pages: 1-5.
- Kaur N. P and Mukhopadhyay A.N.,(1992).** Integrated control of chickpea wilt complex by *Trichoderma* spp. And chemical methods in India. *Tropical Pest Management.*, **38** : 372-375.
- Kaur R. Singh R. S. and C. Alabouvette, (2007).** Antagonistic activity of selected isolates of fluorescent *Pseudomonas* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri*. *Asian Journal of Plant Sciences* **6** (3) : 446-454.
- Kaur R., (1992).** Phytoxicity of solanapyrones produced by the fungus *Ascochyta rabiei* and their possible role in blight of chickpea (*Cicer arietinum*). *Plant Sci.* **109**:23-29.
- Kaur R., (2003).** Characterization of selected isolates of Non- pathogenic *Fusarium*, fluorescent pseudomonads and their efficacy against chickpea wilt. Ph.thesis, Punjab Agricultural University, Ludhiana, pp : 185.
- Keel CD, Weller M, Natsch A, Defago G, Cook RG, Thomashow LS (1996).** Conservation of the 2,4 diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among *fluorescens Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 552-563.
- Keel, C., U. Schnider, M. Maurhofer, C. Voisard and K. Laville et al., (1992).** Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant Microb. Interact.*, **5** : 4-13.
- Kennedy, A. C., et L.Z . de Luna. (2004).** Rhizosphere, p. 399-409. *In* D. Hillel, C. Rosenzweig, D. Powlson, K. Scow, M. Singer, D. Sparks (ed.), *Encyclopedia of soil in the environment*. Vol**03**. Columbia University, USA.
- Kersters, I., Huys, G., Van Duffel, H., Vancanneyt, M., Kersters, K., and Verstraete, W. (1996).** Survival potential of *Aeromonas hydrophila* in freshwaters and nutrient-poor waters in comparison with other bacteria. *J Appl Bacteriol* **80**: 266-276.
- Khot GG, Taur P, Daderwal KR (1996).** Rhizobacteria from chickpea (*Cicer arietinum* L.) rhizosphere effective in wilt control and promote nodulation. *Indian Journal of Microbiology* **36**: 217-222.
- Kim, D.-S., Cook, R. J., and Weller, D. M. (1997).** *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology* **87**:551-558.
- King, E.D., Ward, M.K. and Raney, D.E., (1954).** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* **44**: 301-307.
- Kinsinger R.F., Shirk M.C., Fall R. (2003).** Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *J. Bacteriol.* **185**: 5627–5631
- Kishore, G.K., Pande, S. and Podile, A.R., (2005).** Biological control of late leaf spot of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with chitinolytic bacteria. *Phytopathol.* **95**:123–132.
- Kloepper J.W, Ryu CM, Zhang S (2004).** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* **94**: 1259-1266.

- Kloepper, J. W., et M. N. Schroth (1978).** Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. pp. 879-882. In: *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, 2. Station de Pathologie Végétale et de Phytobactériologie, INRA, Angers, France.
- Knox, O. G., Killham, K. and Leifert, C., (2000).** Effects of increased nitrate availability on the control of plant pathogenic fungi by the soil bacterium *Bacillus subtilis*. *ApplSoil. Ecol.*, **15** : 227-231.
- Kormmesdhal T., J.,J., Chistenen et R. A. Frederiksen.(1970).** A half century of research on Minnesota on flax wilt caused by *Fusarium oxysporum*. University Minnesota Agric. Experiment. Techn. Bull. USA no 273,35pp.
- Kovacs, N., (1956).** Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, 178-703.
- Kumar, A. G., Gowrich, R. and Shivanand, P. G., (1997).** Anti-staphylococcal activity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Sci.*, **72** : 580-582.
- Ladizinsky G., (1975).** A new Cicer from Turkey., Notes Roy. Bot. Gard. Edinb. (in press) In Muehlbauer F.J.Rajesh. P ; N., (2008). Chickpea, a common source of protein and (eds.) genomics of Tropical crop plants.
- Lamari Lynda, Bouras Noureddine, Boudjella Hadjira, Ould El Hadj-Khelil Aminata, Ould El Hadj Mohamed Didi and Sabaou Nasserline (2014).** Influence De Quelques Souches Bacteriennes D'origine Saharienne Sur L'expression De La Fusariose Du Lin Et Du Palmier Dattier, Issn 2170-1318.
- Landa BB, Navas-Cortés JA, Hervás A, Jiménez-Díaz RM, (2001).** Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on suppression of Fusarium wilt of chickpea by rhizosphere bacteria. *Phytopathology* **91** : 807–16.
- Landa. B.B., Navas-cortes J.A. and Jimenez-Diaz R.M., (2004).** Integrated management of Fusarium Wilt of chickpea Wilt sowing date, host resistance, and biological control. *Phytopathology.*, **94** :946- 960.
- Larkin R.P. and Fravel D. R, (2002).** Mechanisms involved in biological control of Fusarium Wilt of cucumber with strains of non pathogenic *Fusarium oxysporum* phytopathology. **81** : 462- 469.
- Larrent J. P., (2000).** Introduction à la nouvelle classification bactérienne- les principaux groupes bactériens, édition Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- Latour, X. and Lemanceau, P., (1997).** Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp., *Agronomie*, **17**: 427–443.
- Latour, X., Corberand, T., Laguerre, G., Allard, F. and Lemanceau, P., (1996).** The composition of fluorescent *Pseudomonad* populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl. Environ.Microbiol.* **62**: 2449-2456.
- Leclere, V., Marti, R., Béchet, M., Fickers, P., Jacques, P. (2006).** The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surfaceactive properties. *Arch. Microbiol.* **186** : 475–483.
- Lee J.Y and Hwang B. K.,(2006).** Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Mycotoxin Research.*, **22** :73-74.
- Leelasuphakul, W., P. Sivanunsakul et S. Phongpaichit (2006).** Purification, characterization and synergistic activity of [beta]-1,3-glucanase and antibiotic extract from an

antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme Microb. Technol.* **38**:990-997.

Lelliott, R.A., Billing, E. and Hayward, A.C., 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *J. Appl. Bacteriol.* **29**: 470–489.

Lemanceau P., Expert D., Gaymard F., Bakker P. A. H. M., Briat J. F.,(2009). Role of iron in plant–microbe interactions. *Advances in Botanical Research*, **51**: 491-549.

Lemanceau, P. (1992). Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes: exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescents. *Agronomie* ,**12** :413-437.

Leslie J. F and Summerell B. A., (2006). The Fusarium laboratory Workshop : a recent history. *Mycotoxin Research.*, **22** : 73- 74.

Liddell C. M. and Barrages W.L.,(1983). Laboratory manual for Fusarium research. University of Sidney. P 162.

Lindberg, G. D., (1981). An antibiotic lethal to fungi. *Pl. Disease*, **65** : 680-683.

Logan N. A., Turnbull P. C., (2000). Bactérie aérobies sporulées. In Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C.(Eds): *Précis de Bactériologie Clinique*, Edition ESKA, Paris, 965-981.

Logan, N. A. and De Vos, P., (2009). Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, 174AL. pp: 21-128. *In*: De Vos, P.; Garrity, G.; M. Jones, D.; Krieg, N. R.; Ludwig, W.; Rainey, F. A.; Schleifer, K. H. and Whitman, W. B., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed.*, vol. 3: *The Firmicutes*. Springer Science + Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA.

Lolloo, R., Maharaih, D., Görgens, J., Gardiner, N. (2010). A downstream process for production of a viable and stable *Bacillus cereus* aquaculture biological agent. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **86**: 499-508.

Loper JE, Schroth MN, (1986). Importance of siderophores in microbial interactions in the rhizosphere. In: Swinburne TR, ed. *Iron, Siderophores and Plant Diseases*. New York: Plenum Press, 85–9.

Lugtenberg, B., et F. Kamilova. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**: 541-56

Mahaffee, WF. et JW. Kloepper (1997). Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with field grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Microbiol Ecol* **34**:210–223.

Malhotra R. S., Pundir K. P ; et Slindkard A. E.,(1987). Genetic ressources of chickpea. Pp. 11- 34 In : Saxena H.C. and Singh K.B. (reds). *The chickpea* CAB International, Walling Ford, UK.

Manjula, K., Kishore, G.K. and Podile, A.R., (2004). Whole cells of *Bacillus subtilis* AF 1 proved effective than cell free and chitinase-based formulations in biological control of citrus fruit rot and groundnut rust. *Can. J. Microbiol.* **50**: 737-744.

Marchadier, E., (2009). Etude fonctionnelle d'un centre d'interactions protéiques chez *Bacillus subtilis* par une approche intégrée. *Thèse de doctorat*, Université de Paris XI, 332p.

Marchal, N.; Bourdon, J. L. et Richard, C., (1982). Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Ed. Doin*, Paris, 482p.

- Matsubara, T. and Zumft, W. G., (1982).** Identification of a copper protein as part of the nitrous oxide-reducing system in nitrite-respiring (denitrifying) pseudomonads. *Arch Microbiol.* **132**: 322-328.
- Mavrodi, O.V., McSpadden Gardener, B.B., Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Weller, D.M. and Thomashow, L.S., (2001).** Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species. *Phytopathol.* **91**: 35–43.
- Mazurier, S., T. Corberand, P. Lemanceau et J.M. Raaijmakers (2009).** Phenazine antibiotics produced by fluorescent pseudomonads contribute to natural soil suppressiveness to *Fusarium* wilt. *ISME J.*, **3**: 977-991.
- Meena, B., Marimuthu, T., Vidhyasekaran, P. and Velazhahan, R., (2001).** Biological control of root rot of groundnut with antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains. *J. Plant Dis. Protect.* **108**: 369–381.
- Mehta, S. and Nautiyal, C. S., (2001).** An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Curr. Microbiol.* **43**: 51-56.
- Mercado-Blanco, J., Rodriquez, J., Hervas, A. and Timnez, D. M., (2004).** Suppression of *verticillium* wilt of olive planting stocks by root associated fluorescent pseudomonads. *Biocontrol.*, **30** : 474-486.
- Messiaen C.M and Cassini R. (1981).** Taxonomy of *Fusarium* In : *Fusarium diseases, biology and Taxonomy.* Nelson P.G., Tousson A et Cook (reds). The pennsylvania state, Press University, Park.
- Meyer, J.M. and Abdallah, M.A., (1978).** The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* **107**: 319-328.
- Meyer, J.M. and Stintzi, A., (1998).** Iron metabolism and siderophores in *Pseudomonas* and related species. In:Montie, T.C. (Ed.), *Biotechnology Handbooks*, vol. **10**: *Pseudomonas*. Plenum Publishing Co., New York, N.Y., pp. 201–243.
- Mezaache, S. (2012).** Localisation Des Déterminants De La Suppression De Quelques Souches De *Pseudomonas* Isolées De La Rhizosphère De La Pomme De Terre.Thèse de Doctorat, Université Ferhat Abbas, Sétif.
- Migula, W. (1894).** Ueber ein neues System der Bakterien. *Arbeiten aus dem bakteriologischen Institut der technischen Hochschule zu Karlsruhe* **1**:235-238.
- Miller, J.H., (1974).** *Experiments in Molecular Genetics*, second ed. Cold Spring Harbor, New York, p. 31-36.
- Miraza, M S., W. Ahmed, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand et KA. Malik (2001).** Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micropropagated sugarcane in vitro. *Plant Soil*, **237**:47–54.
- Mishra, A. K., Dutta, S. and Dileep Kumar, B. S.,(2005).** Effect of florescent *Pseudomonas* strains on crop enhancement and suppression of root diseases of tea. *Proc. Asian Conf. on Emerging Trends in Pl. Microbe Interactions*, Ed. S. S.
- Molot P. M., and Mas. P., (1975).** Influence de la température sur la croissance mycélienne et le pouvoir pathogène de quatre races physiologiques de *Fusarium oxysporum* f.sp. melonis. *Annals of phytopathology.* **7** : 175-178.

- Molot P. M., Cornus M., Ferriere H. et Lombard D., (1990).** Evolution de la fusariose de l'asperge en condition hivernales. Influence du froid sur la réceptivité de la plantes, utilisation des greffes « frigo ». *Review Horticulture.*, **303** : 33-36.
- Montealegre J.R., Herrera, R., Velásquez, J.C., Silva, P., Besoain, X., Pérez, L.M., (2005).** Biocontrol of root and crown rot in tomatoes under greenhouse conditions using *Trichoderma harzianum* and *Paenibacillus lentimorbus*. Additional effect of solarisation. *Electronic Journal of Biotechnology* **8**(3): 249-257.
- Moreno M. T. and Cubero J. I., (1978).** Variation in cicer arietinum L. *Euphytica* **27** : 465-485.
- Muehlbauer F.J. and Rajesh P.N., (2008).** Chickpea, a common source of protein and starch in the semi- arid tropics. PH. Moore, RMing (eds) genomics of tropical crop plants.
- Mukerji K. G., Rajev H., Upadhyay OB., Chamalo P. and Dubey P., (2009).** Interated pest and diseases management. Publishing corporation 4435- 36/7, Anser Rood, Darya Ganj, New Delhi- 110002, 710Pages. Printed at Balaji offset Navis Shahdara, Delhi, 32.
- Muriel E. Rhodes (1959).** The Characterization Of *Pseudomonas Fluorescens*, Rhodesm., E. *J. Gen. Microbiol.* **21** : 221-265.
- Nagórska, K., Bikowski, M., & Obuchowski, M. (2007).** Multicellular behavior and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica*, **54**(3), 495-508.
- Naik, P. R. and Sakthivel, N., (2006).** Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp.strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Res. Microbiol.* **157**: 538–546.
- Nautiyal, CS. (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, **170**: 260-270.
- Navas-Cortés J.A., Alcalá-jimenez A. R., Hau B.and Jimenez-Diaz R.M.,(2000).** Influence of inoculum density of races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f.sp. ciceris on development of *Fusarium* Wilt in chickpea cultivars. *European Journal pathology.*, **106** : 136-146.
- Neilands, J.B., (1995).** Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Bio. Chem.* **270**: 26723–26726.
- Nelson, P. E.; Toussoun, T. A. et Marasas, W. F. O., (1983).** *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. London, PA: *Pennsylvania State Univ. Press*, 193p.
- Nene Y. L. and Reddy M.V.,(1987).** Chickpea diseases and their control. Pages 233- 370 In : the chickpea Saxena M.C and Singh K. B. red. Walking ford oxford shire, UK : CAB international.
- Nene Y. L. et Haware M.P. and Reddy M.V., (1979).** Diagnosis of some Wilt- like disorders of chickpea (*Cicer arietinum*). *ICRISAT information Bulletin.*, **3**: 1- 44.
- Nishiyamma, , Horinouchi., Kobayashim, .,Nagasawta., Yamadah, ., Bepput, . (1992).** Cloning and characterization of genes responsible for metabolism of nitrile compounds from *Pseudomonas chlororaphis* B23, *J. Bacteriol.* **173**, 2465-2472.
- O’Sullivan, D. J. and O’Gara, F., (1992).** Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.*, **56** : 662-676.

- Oberhansli, T., Défago, G. and Hass, D., (1991).** Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHAO of *Pseudomonas fluorescens*: Role of tryptophan side chain oxidase, *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2273–2279.
- Odds F.C., Van Gerven F. Espinel. Ingroff A., Barlett M.S., Ghannoun M.A., Lancaster M.V., Pfaller M ;A., Rex J.H., Rinaldi M.G. and Walsh T.J.,(1998).** Evolution of possible correlations between antifungal susceptibles of filamentous fungi in vitro and antifungal treatment outcomes in animal infection models. *Antimicrobiology Agents chemother.* **42** : 282-288.
- Ohri D. and Pal M.,(1991).** The origine of chickpea (*Cicer arietinum* L.) Karyotype and nuclear DNA amount. The genetical society of great Britain *Heredity.*, **66** : 367- 372.
- Okulate, M. A., (2009).** Antimicrobial activity of bioactive compound(s) produced by *Bacillus* species, *Final Report for Microbial Diversity Course*, 14p. http://courses.mbl.edu/microbialdiversity/research_projects/research_projects_docs_FinalReports_2009/BolajiOkulate_FinalReport.pdf
- Ordentlich, A., Elad, Y. and Chet, L., (1988).** The Role of Chitinase of *Serratia marcescens* in Biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathol.* **78**: 84-88.
- P. S. Nikam, G. P. Jagtap, and P. L. Sontakke, (2007).** Management of chickpea wilt caused by *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*, *African Journal of Agricultural Research*, vol. **2** (12), pp. 692-697.
- Pacome A. ; Nouvamo N. ; Nadige A. A. ; Emma W. ; Gachomo, Hafiz A. Salami ; Farid Baba-Moussa ; Adolphe Adjanohoun, Simen O.Katchoni and Lamine Baba-Moussa., (2015).** Metabolic and biofungicidal properties of maize rhizobacteria for growth promotion and plant disease resistance. *African Journal of biotechnology.* Vol **14** (9), PP. 811-819.
- Pacucci G., Troccoli C., Et Leoni B. (2006).** Supplementary Irrigation on Yield of Chickpea Genotypes in a Mediterranean Climate. *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal.* Manuscript LW 04 005. Vol. **VIII**. May.
- Pal, K. K., Tilak, K. V. B. R., Saxena, A. K., Dey, R. and Singh, C. S., (2000).** Monitoring a biocontrol rhizobacterium *Pseudomonas glumae* using Tn5 : : lac Z marker. *Indian J. Microbiol.*, **40** : 21-24.
- Palleroni, N. J. (2005).** Genus I. *Pseudomonas*, p. 323-379. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Part B. The Gammaproteobacteria.* Springer, New York. handbook 1. *Pseudomonaceae.* In : *Bergey's manual of systematic bacteriology.* Volume 1.
- Palleroni, N. J., M. Doudoroff, R. Y. Stanier, R. E. Solanes, and M. Mandel.(1970).** Taxonomy of the aerobic pseudomonads: The properties of the *Pseudomonas stutzeri* group. *J. Gen. Microbiol.* **60**:215-231.
- Palleroni, N. J., R. Kunisawa, R. Contopoulou, and M. Doudoroff. (1973).** Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **23**:333-339.21.
- Palleroni, N.J., (1984).** Genus I. *Pseudomonas* Migula In: Krieg, N.R., Holt, J.G.(Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I. Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, pp. 141–171.
- Palleroni, N.J., (1992).** Present situation of the taxonomy of the aerobic Pseudomonads. In: Galli, E., Silver, S., Wiltholt, B. (Eds.), *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology.* American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 105–1105.

- Palleroni, N.J., (1993).** *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **64**: 231–251.
- Palumbo, J. D., Yuen, G. Y., Jochum, C. C., Tatum, K. and Kobayashi, D. Y. (2005).** Mutagenesis of *-1,3-glucanase* Genes in *Lysobacter enzymogenes* Strain C3 Results in Reduced Biological Control Activity toward Bipolaris Leaf Spot of Tall Fescue and Pythium Damping-off of Sugar Beet. *Phytopathol.*, **95**: 701-707.
- Parvathi, A.; Krishna, K.; Jose, J.; Joseph, N. and Nair, S., (2009).** Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. *Braz. J. Microbiol.*, **40**: 269-275.
- Patel DK, Murawala P, Archana G, Naresh Kumar G (2011).** Repression of mineral phosphate solubilizing phenotype in the presence of weak organic acids in plant growth promoting fluorescent pseudomonads. *Bioresour Technol* **102**:3055–3061
- Paterson A.H., Bowers J.E., Burow M.D., Draye X., Elsik C.G., Jiang C.X. Catherine S.K., Lan T.H., Lin Y.R., Ming R. Et Wright R.J, (2000).** Comparative Genomics Of Plant Chromosomes.
- Patil. S, C. T. Shivannavar¹, M. C. Bheemaraddi¹, and S. M. Gaddad ;(2015).** Antiphytopathogenic and Plant Growth Promoting Attributes of *Bacillus* Strains Isolated from Rhizospheric Soil of Chickpea, *J. Agr. Sci. Tech. (2015) Vol. 17*: 1365-1377
- Peix, A., Rivas, R., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Rodriguez-Barrueco, C. and Velazquez, E., (2003).** *Pseudomonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate *in vitro*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 2067–2072.
- Pérez-García A., Romero D. & de Vicente A., (2011).** Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **22** (2), 187-193.
- Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S. and Fernández, F.J., (2007).** O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J. Microbiol. Methods.* **70** : 127–131.
- Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S. and Fernández, F.J., (2007).** O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J. Microbiol. Methods.* **70** : 127–131.
- Perry, J. J.; Staley, J. T. et Lory, S.,(2004).** Microbiologie cours et questions de révision. *Dunod*, Paris, 891.
- Peypoux, F., J. M. Bonmatin et J. Wallach (1999).** Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Environ Microbiol.* **51**:553-563.
- Pfohl-Leszkowicz A., (2001).** Définition et origine des mycotoxines in les mycotoxines dans l'alimentation, Evolution et gestion du risque, Ed.tech and Doc, 3-14.
- Prescot L. M., (2002).** Microbiology, 5TH edition, P : 120-150.
- Prescot L. M., Harley J. P., Klein D. A. (2007).** Microbiology de Boeck, 3^{ème} édition Français.
- Priest, F. G., (1989).** Isolation and Identification of Aerobic Endospore-Forming Bacteria. Chapter 3. *In*: Harwood, C. R., *Bacillus*. *Plenum Press*, New York, pp: 27-51.
- Rahman M, Punja ZK. (2005).** Biochemistry of ginseng root tissues affected by rust root symptoms. *Plant Physiol Biochem*; **43**:110-314.

Rajesh Kumar Singh • D. Praveen Kumar • Pratiksha Singh •, Manoj Kumar Solanki • Supriya Srivastava • Prem Lal Kashyap • Sudheer Kumar • Alok K. Srivastava • Pradeep K. Singhal • Dilip K. Arora (2014). Multifarious plant growth promoting characteristics of chickpea rhizosphere associated Bacilli help to suppress soil-borne pathogens, *Plant Growth Regul* **73**:91–101.

Ramachandran, K., Srinivasan, V., Hamza, S., Anandaraj, M. (2007). Phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere soil and its growth promotion on black pepper (*Piper nigrum* L.) cuttings. *Developments in Plant and Soil Sciences* **20**, 102, 325–331.

Ramalho, R., Cunha, J., Teixeira, P. and Gibbs, P. A., (2002). Modified pseudomonas agar: new differential medium for the detection/ enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water. *J. Microbiol. Meth.* **49** : 69–74.

Ramette, A., Moenne-Loy and Defago, G., (2006). Genetic diversity and biocontrol potential of fluorescent pseudomonads producing phloroglucinols and hydrogen cyanide from Swiss soils naturally suppressive or conducive to *Thielaviopsis basicola* mediated black rot of tobacco. *FEMS Microbiol Ecol.*, **55** (3) : 369-381.

Ramey, B.E., Koutsoudis, M., von Bodman, S.B., Fuqua, C. (2004). Biofilm formation in plant-microbe associations. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 602–609.

Ramos, J.L. (2004). *Pseudomonas*. Kluwer Academic Publisher, New-York. Rebiere-Huet, J., Guerillon, J., Pimenta, A.L., Di Martino, P., Orange, N., and Hulen, C. (2002) Porins of *Pseudomonas fluorescens* MFO as fibronectin binding proteins. *FEMS Microbiol Lett* **215**: 121-126.

Rao, C. V. S., Sachan, I. P. and Johri, B. N., (1999). Influence of fluorescent pseudomonads on growth and nodulation of lentil (*Lens esculentus*) in *Fusarium* infested soil. *Indian J. Microbiol.*, **39** : 23-29.

Rapilly F., (1968). Les techniques de mycologie en Pathologie végétale. Annueles des Epiphytes, Vol. **19**. Institut National de la recherche Agronomique, Paris, 102pp.

Rhrif A.,(1990). Trachéomycoses et pourriture racinaire du pois chiche (*Cicer arietinum* L.). Mémoire de 3^{ème} cycle. Institut Agronomique et vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc.

Richardson A. E. (2001). Prospects for using soil microorganism to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust. J. Plant Physiol.* **28**: 897-906.

Rocher F. (2004). La lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : évolution du système phloémique de nouvelles molécules à effet fongicide et d'activateurs de réactions de défense, Thèse de Doctora, Université de POITIERS.

Rodrigues, A.A.C. and M. Menezes, (2005). Identification and pathogenic characterization of endophytic *Fusarium* species from cowpea seeds. *Mycopathologia*, 159: 79-85.

Romanenko VM, Alimov M (2000). Ability of representatives of *Pantoea agglomerans* as well as *Bacillus subtilis* and some species of *Pseudomonas* genus to inhibit growth of phytopathogenic bacteria and micromycetes and regulate the plant growth. *Microbiology Journal* **62**: 29-37.

Rosa Marina Arvayo-Ortiz, Martin Esqueda, Evelia Acedo-Felix, Alfonso Sanchez and Aldo Gutierrez (2011). Morphological Variability and Races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* Associated with Chickpea (*Cicer arietinum*) Crops, *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* **6** (1): 114-12

- Rosenberfg. ,A . (1990)**, The bacterial flora of natural mineral waters and potential problems associated with its digestion, *Riv. Ital. Ig.* **50**,303-310.
- Rouhani H.,(1978)**.etude de la microflore fongique pathogène sur racines et tiges de maize, mémoire Ingénieur en biologie appliquée à l'agriculture. ENSA-M(FRA)., 125p.
- Rouibah M.,(1987)**. The contribution to the study of the wilting of the chickpeas in Algeria. Institut national Agronomique El-Harrache- Algérie, 51p.
- Ryu, C.M., M.A. Farag, C.H. Hu, M.S. Reddy, H.X. Wei, P.W. Paré., et J.W. Kloepper. (2003)**. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**: 4927-4932.
- Ryu, R. et C.L. Patten. (2008)**. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by 4 TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *Am. Soc. Microbiol.*, **19**: 1-35.
- Sadfi, N.; Chérif, M.; Hajlaoui, M. R.; Boudabbous, A. and Bélanger, R.,(2002)**. Isolation and partial purification of antifungal metabolites produced by *Bacillus cereus*. *Ann. Microbiol.*, **52**: 323-337.
- Saikia, R., K. Singh and D. Arora, (2004)**. Suppression of Fusarium-wilt and charcoal rot of chickpea by *Pseudomonas aeruginosa* RsB29. *Indian J. Microbiol.*, **44**: 181-184.
- Salisbury, F.B. (1994)**. The role of plant hormones. Marcel Dekker, (ed.). New York, USA. M. M.
- Santos, E. R., Gouveia, E. R., Mariano, R. L. R., & Souto-Maior, A. M. (2006)**. Controle biológico da mancha aquosa do melão por compostos bioativos produzidos por *Bacillus* spp. *Summa Phytopathologica*, **32**(4), 376-378.
- Sarhan, S.M. Ezzat, A.A. Tohamy, A.A. El-Essawy, and F.A. Mohamed, (2001)**. "Biocontrol of *Fusarium* tomato wilt diseases by *Bacillus subtilis*" *Egypt. J. Microbiol.*, **36**, pp. 376-386.
- Sawada, H., Kanaya, S., Tsuda, M., Suzuki, F., Azegami, K., and Saitou, N. (2002)**. A phylogenomic study of the OCTase genes in *Pseudomonas syringae* pathovars: the horizontal transfer of the argK-tox cluster and the evolutionary history of OCTase genes on their genomes. *J Mol Evol* **54**: 437-457.
- Saxena N.P.(1984)**. adaptation of chickpea and pigeonpea to abiotic stresses. ICRISTAT 1987. Proceeding of the consultants workshop, 19-21 December 1984. ICRISTAT Patancheru, AP 502 324 India.
- Saxena, A., Sharma, A., Goel, R. and Johri, B. N., (1996)**. Functional characterization of a growth promoting fluorescent pseudomonad from rajanigandha rhizosphere. *37th Ann. Conf. Assoc. Microbiol. India*, December 4-6, IIT, Chennai, p. 135.
- Saxena, M. C. (1988)**.Status of chickpea in the mediterranean basin. Proceedings of the international work shop on present Status and futures prospects of chickpea crop production and improvement. In: the Mediterranean countries. CIHEAM/ EEC AGIMED/ICARDA, 11-13July 1988, Zaragoza, Spain.
- Saxena., (1987)**. Agronomy of chickpea. In : Saxena N., Johansen P.C. and Sing K B., eds. The chickpea. Wallingford, UK: CAB International, 207-232.
- Schippers ,B., AW. Bakker et PAHM. Bakker (1987)**. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Ann. Rev. Phytopathol.* **25**:339-358.

- Schisler, M. J.; Khan, N. I.; Boehm, D. A.; Lipps, P. E. and Slininger, P. J., (2004).** Field testing of antagonists of *Fusarium* head blight incited by *Gibberella zeae*. *Biological Control*, **29**: 245 – 255
- Schwyn, B. and Neilands, J.B., (1987).** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Ann. Biochem.* **160**: 47– 56.
- Seldin, L., A. Soares Rosado, DW. da Cruz, A. Nobrega, JDE. van Elsas et M. Paiva (1998).** Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3860–3868.
- Sharma D. K. And Muehlbauer F. J., (2007).** Fusarium Wilt Of Chickpea: Physiological Specialization. Genetics Of Resistance And Resistance Gene Tagging. *Euphytica.*, **157**: 1-14.
- Sharma P.C. And Gupta P.K. (1986).** Cytogenetics Of Legume Genera Cicer L. And Lens L. In: Gupta, P.K. And Bahl, J.R. (Eds) Genetics And Crop Improvement. Rastogi & Co, Meerut, India. Inyadav S.S, Redden R.J, Chen W And Sharma B (Eds). Chickpea Breeding And Management Cab International 2007- Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India.P329
- Shida, O., H. Takagi, K. Kadowaki, and K. Komagata. (1996).** Proposal of two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *International Journal of systematic Bacteriology* **46**:939-946.
- Shida, O.; Takagi, H.; Kadowaki, K.; Komagata, K. (1996).** Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 939-946.
- Shidao, Takano, Takaghi, Kadowakki, Kobayashsi. ,(1992).** Cloning And Nucleotide Sequence Of The Maltopentaose-Forming Amylase Gene From *Pseudomonas* Sp. Ko-8940, *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**,76-80.
- Shivakumar, B., (2007).** Biocontrol potential and plant growth promotional activity of fluorescent
- Shivani, B., Dubey, R. C. And Maheshwari, D. K., (2005).** Enhancement Of Plant Growth And Suppression Of Collar Rot Of Sunflower Caused By *Sclerotium Rolfsii* Through Fluorescent *Pseudomonas*. *Indian Phytopathol.*, **58**(1) : 17-24.
- Silo-Suh LA, Lethbridge BJ, Raffel SJ, He H, Clardy J, Handelsman J, (1994).** Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 2023–2030.
- Singh B.P; Saikia R., Yadav M., Sing R., Chauhan V.S. and Arora D.K., (2006).** Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. ciceri causing Wilt of chickpea African journal of Biotechnology., **6**: 497-502.
- Singh F. and Diwakar., (1995).** chickpea botany and production Practices. Skill Development series ICRISAT India., **16** : 502- 324.
- Singh K.B., (1990).** Prospect Of Developing New Gentic Material And Breeding Methodologies For Chickpea In Improvement. Option Méditerranéennes, Séries Séminaires., **9** : 43- 50.
- Singh K.B., Ocampo B. And Robertson L. D., (1998).** Diversity For Abiotique And Biotic Stress. Ressources And Crop Evolution **45** : 9 – 17.
- Singh, (1985).** National quality of chickpea (*cicer arietinum*) current status and future research needs. Quality plant foods Human Nutrition., **35**: 339 – 351.

- Slama F. (1998).** Cultures industrielles et légumineuses à graines. (Ed. Centre de diffusion Universitaire Tunisie, en Arabe) in BEN MBAREK. K .2011 : Comportement du pois chiche (*Cicer Arietinum*) du type « Kabuli » vis-à-vis du stress hydrique et identification des génotypes tolérants la sécheresse ; Th. Doct., instit supé agronomique de Chott Meriem – Tunisie.p14.15.17
- Slepecky, R. A. And Hemphill, H. E., (2006).** The Genus *Bacillus*—Nonmedical Chapter 1.2.16, pp: 530–562. In: Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K. H. and Stackebrandt, E., *The Prokaryotes 3rded.* Vol. 4, *Springer Science+Business Media*, LLC.
- Smibert, R.M. and Krieg, N.R., (1994).** Phenotypic characterization. In: *Methods for general and molecular bacteriology*. P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, and N. R. Krieg(ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp.607–654
- Smith J.E and Moss M.O. (1985).** Mycotoxis Formation.*Analy Signif.* 31-49.
- Smithson J. B. Thompson J. A and Summerfield R. J., (1985).** Chickpea (*Cicer arietinum* L.) In: Summerfield R. J. and Robert E.H.(Eds), grain legume crop, PP. 312- 390. Collins, London, UK.
- Snyder W. C and Hansen H. N.,(1940).the species concept in *Fusarium* Annual Journal of Botany., **27**: 64-67.
- Song, Z.; Liu, K.; Lu, C.; Yu, J.; Ju, R.; Liu, X. (2011).** Isolation and characterization of a potential biocontrol *Brevibacillus laterosporus*. *Afr. J. Microbiol. Res.*, **5**, 2675-2681.
- Staginnus C., Winter P., Desel C., Schmidt T. and Kahl G.,(1999).** Molecular structure and chromosomal localization of major repetitive DNA families in the chickpea (*cicer arietinum* L.) genome. *Plant molecular Biology* **39**: 1037- 1050.
- Stanier, R.Y, Palleroni, N.J. and Doudoroff, M., (1966).** The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**: 159-271.
- Steenhoudt, O. et J. Vanderleyden (2000).** *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects, *FEMS Microb.Rev.*,**24**: 487-506.
- Stefanie Klein,¹ Carlos Lorenzo,² Sonja Hoffmann,¹ Johannes M. Walther,¹ Sonja Storbeck,¹ Tanja Piekarski,¹ Bryan J. Tindall,³ Victor Wray,⁴ Manfred Nimtz⁴ and Jürgen Moser (2009).** Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to various conditions includes tRNA-dependent formation of alanyl-phosphatidylglycerol, *Molecular Microbiology* **71**(3), 551–565.
- Sullivan, B., (2005).** Whole Genome Phylogeny Reconstruction for the Genus *Bacillus*. *Thèse*, N.U.I. Maynooth, Department of Biology, 40p.
- Summerbell R. C et Schroers H. J., (2002).** Analysis of phylogenetic relationship of cylindrocarpon Lichenicola and Acremonium falciforme to the *Fusarium solani* species complex and a review of similarities in the spectrum of opportunistic infection caused by these fungi. *Journal of Clinical Microbiology.* **40**:2866-2875.
- Sundaramoorthy, S. and P. Balabaskar, (2013).** Evaluation of combined efficacy of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* in managing tomato wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). *Plant Pathol. J.*, **12**: 154-161.
- Suryakala, D., Umamaheshwari Devi, P. and Vijaya Lakshmi, K., (2004).** Chemical characterization and *in vitro* antibiosis of siderophores of rhizosphere florescent pseudomonads. *Indian J. Microbiol.*, **44**: 105-107.

- Talaro K. P et Talaro A. (2002).** The Gram positive Bacilli of medical importance In : Foundation in microbiologie 4th Edition.
- Tello J. C. and Lacasa A.,(1990).** Fusarium oxysporum en los cultivos intensivos del litoral mediterraneo de Espana-Fases parasitica (Fusariose vascular del Tomate y del clavel) y no parasitica. Bolsan Veg no., 19-190.pp.
- Thakore Y.,(2006).** The biopesticide market for global agricultural use, industrial biotechnology. 2(3) : 294-208.
- Tjamos, E.C., Tsitsigiannis, D.I., Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Katinakis, P., (2004).** Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarised soils as biocontrol agents against *Verticillium dahlia* of solanaceous hosts. *European Journal of Plant Pathology* 110(1): 35-44.
- Todar, K.,(2008).** Online Textbook for Bacteriology: The Genus *Bacillus*. <http://www.textbookofbacteriology.net>.
- Toussons T. A. and Nelson P.E., (1976).** Apictorial guide to the identification of Fusarium species. Pennsylvania state University Park, 51pp.
- Traperco-Casas A. et Jimenez-Diaz D. M., (1985).** Fungal Wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain *Phytopathology* 75 : 1146-1151
- Trapero-Casas A.,(1983).** Wilt and root of chickpea in the Guadelquivir valley : Importance, distribution, etiology, epidemiology and control (Original in Spanish) Doctorat thesis, University of Cordoba, 295pp.
- Travers, R. S., Martin, P. A. W. and Reichelderfer, C. F., (1987).** Selective process of efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53 : 1263-1266.
- Tripathi, M. and Johri, B. N., (2002).** *In vitro* antagonistic potential of fluorescent pseudomonads and control of sheath blight of maize caused by *Rhizoctonia solani*. *Indian J. Microbiol.*, 42 : 207-214.
- Trujillo, E., B. Moreno, R. Acevedo and R. Vera, (2005).** Genetic variability of *Fusarium* spp. causing of the vascular wilt in carnation by electrophoresis. *Fitopatol. Venez.*, 18: 9-14.
- Tsakelova, EA., SY. Klimova, TA. Cherdyntseva, et AI. Netrusov (2006).** Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 42:117–126
- Upadiyaya H. D., Dwivedi S. L., Gowada C. L. L. and Singh S.,(2007).** Identification of diverse germplasm lines of agronomique traits in a chickpea (*Cicer arietinum* L.) core for use in improvement. *Field crops reseach.*, 100 : 153- 158.
- USDA. (2004) United States Department of Agriculture.
- Valcilova K., Ohri D., Vrama J., Cihalicova J., Kubalakova M., Kahl G. and Dolezel J., (2002).** Development of flow cytogenetics and physical genome mapping in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *chromosome Research.*, 10 : 695-706.
- Van Der Maesan L.J.G., (1987),** Origine, history and taxonomy of chickpea. Pages 11-34 In Singh, F. Diwakar, B.1995. chickpea botany and production practices. Skill Development Series n°. 16, ICRISAT.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. and Pieterse, C. M. J., (1998).** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 453–483.

- Van Loon, L.C. (2007).** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Euro. J. Plant Pathol.*, **119**: 243-254.
- Varshney R.K. (2012).** Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. *Nature Biotechnology* **31**.
- Verma, M., Satinder, K. Brar, R.D., Tyagi, R.Y., Surampalli, J. and Valero R., (2007).** Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochem. Eng. J.* **37**: 1–20.
- Vessey, J.K (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, **255** : 571–586.
- Vincent, M. A.; Harrison, L. A.; Brackin, J. M.; Kovocevich, P. A; Mukeiji, P.; Weller, D. A. and Pieson, L. S., (1991).** Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl. Env. Microbiol.*, **57**(10): 2928-2934.
- Visca, P., Imperi, F. and Lamont, I.L., (2007).** Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol.* **15**: 22–30.
- Vujanovic, V., C. Hamel, E. Yergeau and M. St-Arnaud, (2006).** Biodiversity and biogeography of *Fusarium* species from northeastern North American asparagus fields based on microbiological and molecular approaches. *Microbial. Ecol.*, **51**: 242-255.
- Waite B. H. and Stover R. H. (1960).** Studies on Fusarium wilt of Bananas. Variability and the cultivar concept in *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense. *Canadian Journal of Botany.*, **38** : 985-994.
- Walker J. C., (1965).** Use of environmental factors in screening disease resistance. *Annuals review of pathology.*, **3** : 197-208.
- Walsh, U.F., Morrissey, J.P., and O'Gara, F. (2001).** *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr Opin Biotechnol* **12**: 289-295.
- Ward, E., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., Alexander, D. C., Ahl-Goy, P., Metraux, J. P., Ryals, J. (1991).** Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* **3**, 1085–1094.
- Weller DM (1988).** Biological control of soilborn plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **26**: 379-407.
- Wery J., Turc O, Et. Lecoeur J. (1993).** In: K.B. Singh et M.C. Saxena (Eds.). *Breeding for stress tolerance in cool season food legumes*, John Wiley et Sons, Chichester, U.K; pages: 271-272.
- Westerlund J., Compelle R.N and Kimble K. A., (1974).** Fungal root rots and wilt of chickpea in California. *Phytopathology.*, **64** : 432- 436.
- Whipps, J.M., (2001).** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **52**: 487-511.
- Wu, X. Y.; Walker, M. J.; Hornitzky, M. and Chin, J., (2006).** Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. *J. of Microbiol. Methods*, **64**: 107-119.
- Xie, H., Pasternak, J.J. and Glick, B.R., (1996).** Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that over produce indoleacetic acid. *Curr. Microbiol.* **32**: 67–71.

Yadav S. S., Redden R., Chen W. and Sharma B.,(2007). Chickpea breeding and management. Cambridge library of congress.

Yap Chin Ann, Awang Ahmad Sallehin, Hairul Azman Roslan, Mohd Hasnain Md Hussain, Samuel Lihan (2015). Antagonistic Activity of Endophytic *Bacillus* Species Against *Colletotrichum Gloeosporioides* for the Control of Anthracnose Disease in Black Pepper (*Piper Nigrum L.*) *G.J.B.A.H.S.*, Vol. 4(2):115-123.

Yobo, K.S.; Laing, M.D.; Hunter, C.H. (2004). Effect of commercially available rhizobacteria strains on growth and production of lettuce, tomato and pepper. *S. Afr. J. Plant Soil*, 21, 230-235.

Yueju Zhao, Jonathan Nimal Selvaraj, Fuguo Xing, Lu Zhou, Yan Wang, Huimin Song, Xinxin Tan, Lichao Sun, Lancine Sangare, Yawa Minnie Elodie Folly, Yang Liu (2014). Antagonistic Action Of *Bacillus Subtilis* Strain SG6 On *Fusarium Graminearum*, *Plos ONE* 9(3): E92486.

Zahir, ZA, M.Arshad et WT. Frankenberger (2004). Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture.*Adv. Agron.*, 81 : 97-168.

Zarrin. F. M. Saleemi, M. Zia, T Sultan, M. Aslam, R, U. Rehman, and M, C. Fayyaz, (2009). Antifungal activity of plant growth-promoting rhizobacteria isolates against *Rhizoctonia solani* in wheat, *African Journal of Biotechnology*, vol. 8 (2) pp. 219-225.

Zeller, S.L., H. Brandt et B. Schmid (2007). Host-Plant Selectivity of Rhizobacteria in a Crop/Weed Model System. *PloS ONE*, 2(9): 1-7.

Zhang, J.X., Xue, A.G. (2010). Biocontrol of *Sclerotinia* stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) of soybean using novel *Bacillus subtilis* strain SB24 under control conditions. *Plant. Pathol.* 59: 382-391

Zhou J.W., Chang Y.F., Xu Z.H., Yu Z.N. and Chen S.W (2007). Production of thuringiensin by fed-batch culture of *Bacillus thuringiensis*. Subsp. darmstadiensis 032 with an improved pH-control glucose feeding strategy. *Process Biochemistry.* 42 (1) : 52 – 56.

Annexe

Annexe 1

Tableau A : Effet de la température sur la croissance mycélienne des isolats du FOC.

Isolats	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
FOC1	0	23.66	26.5	40	68.5	62.5	12.5
FOC2	0	27.16	28.33	44.5	62.5	62.5	10
FOC3	0	26	27.5	47.75	64.5	59.75	9.5
FOC4	0	24.66	26.16	48.25	62.5	62.5	9

Tableau B : Effet du pH sur la croissance mycélienne des isolats du FOC (en mm).

pH	5	6	7	8
FOC1	65	58	61	45,25
FOC2	62,50	57,75	62,25	47
FOC3	53	55	54,25	36,50
FOC4	60,50	55,50	54,25	45

Tableau C: Inhibition de la croissance mycélienne des FOC rencontrés par les souches de *Bacillus* à travers les produits diffusibles.

Souches de <i>Bacillus</i>	FOC1	FOC2	FOC3	F.s
B3	52	57.24	56.75	45
B13	60	45.71	40.45	41
B14	42.5	48.57	51.35	35
B22	66	35.13	43.24	27
B27	39.5	51.42	48.64	38.5
B39	70.5	20	45.49	35
B40	69.5	57.25	51.35	47
B41	59.5	48.57	45.94	39
B42	41.5	36	30	22
B45	64	42.85	72.79	55
B46	49.5	42.85	32.34	35
B47	55	51	45	25
B48	48	0	40.54	32
B53	40	57.25	35.13	45
B54	42	54.24	43.23	66
B58	44.5	40	40.50	44
B59	54.5	42.85	13.51	20
B61	77	66.71	55	74
B62	45	0	32.43	31
B63	68.5	45	35	52.5
B64	45.5	65	50	71
B65	61	65.24	0	63
B67	56.5	45	40	27
B69	52.5	0	35.15	66
B70	44	0	59.45	50
B71	45.5	54.28	35.15	24
B72	60	48.57	45.94	65
B73	64.5	48.57	72.97	69
B74	38.5	22	45.94	15
B75	47.5	42.85	27.25	47
B76	38.5	54.28	46	40
B77	47.5	48.57	51.35	53.5
B78	51	45.71	81	24
B79	64	40	59.7	54.5
B80	45	42.85	54.05	58
Moyenne	54,62	28	42,44	43,13

Tableau D: Inhibition de la croissance mycélienne des FOC rencontrés par les souches de *Pseudomonas* à travers les produits diffusibles.

Souches de <i>Pseudomonas</i>	FOC1	FOC2	FOC3	F.s
P3	31	22	45.05	10
P4	66	42.85	45	53.5
P5	63.5	57.14	52	60.5
P8	48	13.51	27.02	47
P11	45.5	57.14	35	42
P25	45	71.42	51	65
P29	52	40	37	67.5
P30	41	54.28	54.05	40
P31	55	5.71	32.43	56
P33	33	28.57	48.54	40
P36	41	40	35.1	66.5
P37	49	0	56.75	51
P39	55.5	2.85	32.1	58
P41	45	27	18.91	45
p43	48.5	40	55	58.5
P44	40.5	54.28	24.32	39
P45	46.5	62.85	43.23	46.5
P48	42.5	22.85	59.45	57
P50	49	40	40.54	49
P53	71	0	32.43	60.5
P56	38	28.57	18.91	63
P57	53	8.57	32.43	60.5
P59	34.5	45	53	59.5
P61	40.5	31.42	5	50
P62	13.5	51.42	54.05	32
P64	45.5	48.57	51.35	63
P65	38	0	16	59.5
P66	36	42.85	46	10
P68	65	57.14	45.94	69
P69	42	31.42	35.1	62
P70	55.5	54.28	43.24	68
Moyenne	47,26	47,26	25,4	39,5

Tableau E : Inhibition de la croissance mycélienne des FOC rencontrés par les souches de *Bacillus* à travers les produits volatiles.

Souches de <i>Bacillus</i>	FOC1	FOC2	FOC3
B3	67	67.27	72.30
B13	36	40	63.07
B14	44.5	50.90	58.46
B22	57	58.18	64.61
B27	38	63.63	35.38
B39	70.5	45.45	46.15
B40	60.5	69.09	21.53
B41	30	12.72	50.76
B42	70.5	57.78	50.50
B45	60.5	29.09	36.92
B46	41.5	69.09	38.61
B47	35	69.09	40.20
B48	57	54.54	46.15
B53	50	70.50	70.15
B54	45	61.81	38.46
B58	43.5	63.63	66.15
B59	14.5	65.45	70.76
B61	9	72.72	72.30
B62	20	23.63	49.23
B64	46.5	43.63	66.15
B65	55	43.63	52.30
B67	30.5	38.46	40.24
B69	15.5	30.90	49.23
B70	46.5	49.09	46.15
B71	57	50.90	58.46
B72	50	54.54	55.38
B73	40.5	54.54	66.15
B74	46.5	43.63	38.46
B75	37	69.09	35.38
B76	34	55	30.76
B77	45	60	46.15
B78	48	69.09	73.84
B79	34	53.84	53.84
B80	19.5	60.71	56.92
Moyenne	42,32	51, 67	53,38

Tableau F: Inhibition de la croissance mycélienne des FOC rencontrés par les souches de *Pseudomonas* à travers les produits volatiles.

Souches de <i>Pseudomonas</i>	Foc1	Foc2	Foc3
P3	37	27.27	38.46
P4	46.5	28.57	58.46
P5	57	37.14	35.38
P8	46.5	51.42	35.38
P11	48	53.84	50.90
P25	55	52.72	60
P29	45	63.63	57
P30	29	69.09	73.84
P31	21	43	34
P33	60.5	54	50.76
P36	37	45.45	40
P37	39.5	52.72	61.53
P39	68	32.72	43.07
P41	77.5	70.90	70.76
P43	50	65.07	70.76
P44	66	47.27	9.84
P45	66	83.07	10
P48	66	70.90	46.15
P50	17	34.54	21.53
P53	52	14.54	66.15
P56	25	45.45	66.15
P57	45	63.63	49.23
P59	4	25.45	36.92
P61	13	50.90	50.76
P62	27.5	72.72	69.23
P64	72	45.45	78.46
P65	9.5	47.27	35.38
P66	42	45.45	66.15
P68	45	45.23	53.84
P69	23	80	10.76
P70	45	60	38.46
Moyenne	40,66	50,95	48,04

Tableau G: Effet des isolats du Foc sur le nombre de ramifications par plant de pois chiche

	Témoins	Foc1	Foc2	Foc3	Foc4	Moyenne
Var1	13.00	17.67	17.00	11.67	14.33	15.17
Var2	11.00	14.33	16.00	14.00	13.67	14.50
Var3	12.00	12.33	13.33	11.00	10.00	11.67
Var4	14.00	15.00	13.33	15.33	14.00	14.42
Var 5	7.50	13.33	13.67	12.67	11.00	12.67
Moyenne	11.50	14.53	14.67	12.93	12.60	13,68

Tableau H: Effet des isolats du Foc sur la longueur de tige par plant de pois chiche

	Témoins	Foc1	Foc2	Foc3	Foc4	Moyenne
Var1	20.85	42.80	36.17	33.00	34.80	36.69
Var2	24.50	46.33	39.75	36.10	36.17	39.59
Var3	24.10	30.73	34.17	26.17	19.33	27.60
Var4	25.85	36.10	38.17	40.03	27.50	35.45
Var 5	13.35	38.17	43.50	35.67	25.40	35.69
Moyenne	21.73	38.83	38.35	34.19	28.64	36,69

Tableau I : Effet des isolats du Foc sur la longueur de racine par plant de pois chiche

	Témoins	FOC1	FOC2	FOC3	FOC4	Moyenne
Var1	13.15	7.90	11.83	12.50	13.27	11,38
Var2	6.50	12.13	14.50	11.17	11.43	12,31
Var3	6.10	15.83	13.83	9.00	7.77	11,61
Var4	8.00	7.83	12.73	8.20	9.10	9,47
Var 5	6.50	15.33	13.83	10.23	15.40	13,70
Moyenne	8.05	11.81	13.35	10.22	11.39	11,69

Tableau J : Effet des isolats du Foc sur le poids racinaire par plant de pois chiche

	Témoins	FOC1	FOC2	FOC3	FOC4	Moyenne
Var1	1.050	1.630	1.133	1.320	1.573	1,414
Var2	0.570	0.853	0.810	1.050	1.293	1,002
Var3	1.705	1.100	0.840	1.010	0.892	0,961
Var4	1.695	1.150	0.460	1.483	1.682	1,194
Var 5	0.275	0.773	0.943	1.140	1.323	1,045
Moyenne	1.059	1.101	0.837	1.201	1.353	1,12

Tableau K : Effet des isolats du Foc sur le poids végétative par plant de pois chiche

	Témoins	FOC1	FOC2	FOC3	FOC4	Moyenne
Var1	0.985	1.520	1.657	1.870	1.590	1,659
Var2	0.280	1.323	1.555	1.535	1.060	1,368
Var3	0.905	1.317	1.423	0.685	0.740	1,041
Var4	1.430	1.573	1.030	1.935	1.545	1,460
Var 5	0.230	1.353	1.727	0.960	0.920	1,240
Moyenne	0.766	1.417	1.478	1.397	1.171	1,35

Résultats de l'identification de souches de *Bacillus* par les galeries CHB 50.

Tableau L : Assimilation des sucres simples par les isolats de *Bacillus* rencontrés.

Souches	3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	15	32	41	42	43	44
B13	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
B22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B39	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
B40	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
B41	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
B45	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
B47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
B48	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
B53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B59	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
B61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
B62	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
B63	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B64	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B65	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
B67	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
B69	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
B72	-	+	+	+		+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
B73	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B79	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-

3 D- arabinose, 4 L-arabinose, 5D- ribose, 6 D-xylose, 7L-xylose, 10 D-galactose, 11 D-glucose, 12 D- fructose, 13 D-mannose, 14 l-sorbose, 15L-rhamnose, 32 D- trehalose, 41 D-lyxose, 42 D- tagatose, 43 D-fucose, 44 L-fucose.

Tableau M: Assimilation des sucres complexes par les isolats de *Bacillus* rencontrés.

Souches	Oligosaccharides								Polysaccharides		
	28	29	30	31	34	35	39	40	27	36	37
B13	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
B22	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
B39	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
B40	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+
B41	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-
B45	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
B47	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
B48	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
B53	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
B59	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
B61	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
B62	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
B63	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
B64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B65	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
B67	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
B69	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
B72	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
B73	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
B79	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+

28 D-maltose ; 29 D- lactose ; 30 D- melibiose ; 31 D-saccharose; 34D- melzitose; 35 D- raffinose; 39 gentibiose; 40 D- turanose; 27D-cellobiose; 36 amidon; 37 glycogen.

Tableau N: Assimilation des polyalcools par les isolats de *Bacillus* rencontrés.

Souches	1	2	8	16	17	18	19	38	45	46
B13	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
B22	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
B39	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
B40	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
B41	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
B45	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
B47	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
B48	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
B53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B59	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
B61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
B62	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
B63	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B64	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B65	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
B67	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
B69	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
B72	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
B73	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B79	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-

1 glycerin ; 2 erythriol ; 8 D-adonitol ; 16 dulcitol ; 17 inositol; 18 D-mannitol; 19 D-sorbitol; 38 xylit; 45 D-arabitol; 46L-arabitol.

Tableau O: Assimilation des hétérosides et acides uroniques par les isolats de *Bacillus* rencontrés.

souches	Hétérosides								Acides uroniques		
	9	20	21	22	23	24	25	26	47	48	49
B13	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
B22	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
B39	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
B40	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
B41	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
B45	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
B47	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
B48	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B53	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-
B59	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
B61	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
B62	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
B63	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
B64	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
B65	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
B67	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
B69	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B72	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
B73	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
B79	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-

9 Méthyl-βD-Xylopyranoside; 20 Méthyl-αD-Mannopyranoside ; 21 Méthyl-αD-Glucopyranoside ; 22 N-AcétylGlucosamine ; 23 AMYgdaline ; 24 ARButine ; 25 ESCuline citrate de fer ; 26 SALicine ; 47 potassium GlucoNaTe ; 48 potassium 2-CétoGluconate ; 49 potassium 5-CétoGluconate.

Résultats de l'identification de souches de *Pseudomonas* par API 20NE.

Tableau P: Résultats des tests conventionnels pour les différentes souches de *Pseudomonas* .

Souches	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG
P29	+	-	-	+	-	-	+	-
P30	-	-	-	+	+	+	-	+
P31	+	-	-	+	+	-	-	+
P36	-	-	+	+	-	-	+	+
P37	+	-	-	+	-	-	+	-
P39	+	-	-	+	+	+	+	+
P41	+	-	-	+	+	-	-	+
P43	+	-	-	+	+	+	-	+
P44	+	-	-	+	+	-	+	+
P45	-	-	-	+	+	+	+	+
P46	+	-	-	+	+	-	+	+
P48	+	-	-	-	-	+	+	+
P50	+	-	-	+	+	-	-	-
P52	+	-	-	+	+	+	+	-
P53	+	-	-	+	+	+	+	+
P56	-	-	+	+	+	+	+	+
P57	+	-	+	+	+	+	-	+
P59	+	-	+	+	+	+	-	+
P61	+	-	+	+	+	+	-	+
P62	+	-	-	+	+	+	-	+
P64	-	-	-	+	+	+	-	+
P65	+	-	+	+	+	+	+	+
P66	+	-	-	+	+	-	+	-
P70	+	-	+	+	+	-	+	-

Tableau Q : Résultats des tests d'assimilation pour les différentes souches de *Pseudomonas*.

Souches	GLU2	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC
P29	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
P30	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
P31	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
P36	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+
P37	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
P39	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
P41	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
P43	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
P44	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-
P45	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
P46	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
P48	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
P50	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
P52	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
P53	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
P56	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
P57	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
P59	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P61	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
P62	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
P64	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
P65	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
P66	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
P70	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-

Tableau R: Mesure de la croissance des souches microbiennes en DO avec différentes concentration de NaCl.

Souches	0 (mM NaCl)	50 (mM NaCl)	100 (mM NaCl)	150 (mM NaCl)	200 (mM NaCl)
B39	0.130	0.091	0.356	0.153	0.139
B40	0.227	0.303	0.649	0.188	0.236
B41	0.085	0.294	0.086	0.102	0.121
B59	0.065	0.163	0.150	0.106	0.186
B61	0.104	0.026	0.160	0.058	0.181
B63	0.857	1.449	0.545	0.344	0.431
B65	0,310	0,230	0,110	0,100	0,80
B73	0.066	0.230	0.087	0.041	0.124
P53	0.432	0.793	0.545	0.315	0.524
P65	0.129	0.519	0.393	0.495	0.299
P66	0.312	0.612	0.010	0.150	0.698
P70	0.374	0.581	0.385	0.119	0.476

Tableau S: Mesure de la croissance des souches microbiennes en DO avec différents pH.

Souches	pH=6	pH=7	pH=8	pH=9
B39	0,010	0,195	0,158	0,011
B40	0,124	0,0130	0,401	0,025
B41	0,124	0,124	0,032	0,010
B59	0 ,010	0 ,346	0,178	0,008
B61	0,010	0,057	0,060	0,009
B63	0,010	0,155	0,181	0,314
B65	0,010	0,300	0,178	0,050
B73	0,124	0,090	0,022	0,010
P53	0,010	0,206	0,165	0,029
P65	0,010	0,330	0,186	0,069
P66	0,124	0,185	0,257	0,022
P70	0,232	0,205	0,046	0,001

Tableau T : Etude des métabolites secondaires produits par les souches de *Bacillus*.

Souches	Prot	Gélat	Amyl	Cellul	AIA	Lipase	HCN	NH ₃	Phosp	Sidéro	Chitin	Chitinase
B3	+++	+	+++	++	-	+	++	+	-	+	++++	25mm
B13	+	+	+++	+	-	-	+	+	-	+	++	10mm
B14	+++	+	+++	+++	-	-	++	+	-	+	+	7mm
B22	+	+	+	+++	+++	+	++	-	-	+	+++	21mm
B27	+++	+	+++	++	-	+	+	-	-	+	+++	17mm
B39	+++	-	+	-	+	+	++	-	+	+	-	-
B40	+++	+	+++	+	+	-	++	+	-	-	+++	16mm
B41	+++	-	+	++	+	+	++	-	-	+	+++	17mm
B42	+++	+	+++	+	+	+	++	+	-	+	-	-
B45	+++	+	+++	+	+	-	++	+	-	+	++	10mm
B46	-	-	+	-	++++	-	++	-	-	-	+	6mm
B47	+++	+	+++	++	-	-	+	+	-	+	+++	16mm
B48	+++	+	++	++	+	-	++	-	-	+	-	-
B53	++	-	++	-	++	+	++	+	+	+	+++	20mm
B54	+++	+	+	-	+++	+	+	+	-	+	++	10mm
B58	+++	-	+++	++	+	+	+	+	-	-	+++	15mm
B59	+	-	+++	+	+	+++	++	+	-	+	-	-
B61	++	+	+++	++	+	-	-	+	-	+	+	6mm
B62	+++	+	+++	+	+++	++	+	+++	-	+	+++	17mm
B64	+	-	+++	-	+++	+	+	-	-	-	+++	16mm
B65	++	-	+++	-	+	+	+	-	-	+	++	11mm
B69	+++	+	+++	+	+	++	++	-	-	-	+++	15mm
B71	++	+	+++	++	-	-	+	+	-	+	++	10mm
B70	+++	-	+++	++	+	-	+	+	-	+	+++	18mm
B72	+	+	++	++	+	++	+	-	-	+	++	10mm
B73	+	+	+++	+	+	+	+	+	-	+	++++	25mm
B76	+++	+	+++	+	-	+	++	++	-	-	+++	15mm
B77	+++	+	+++	+	++	-	++	++	-	+	++	13mm
B78	+++	+	+++	-	-	+	+	+	-	-	+++	21mm
B79	+++	+	++	++	++	-	-	+	-	+	+	8mm
B80	+++	+	+	++	+	-	+	+	-	+	++	15mm

Prot .: protéase ; Gélat.: gélatinase; Amyl.: amylase ; Cellul.: cellulase; AIA: acide indol acétique; Lipase ; HCN: acide cyanhydrique; NH₃: Ammoniaque; Phosp.: Phosphatase ; Sidéro. : Sidérophore, Chitine, Chitinase.

Tableau U : Etude des métabolites secondaires produits par les souches de *Pseudomonas*.

Souches	Prot	Gélat	Amyl	Cellul	AIA	Lipase	HCN	NH3	Phosp	Sidéro	Chitin	Chitinase
P3	+++	+	+++	+	++	+	+	+	+	+	++	12mm
P4	+	+	+++	+	+	+	+	+	-	+	++	10mm
P5	+++	+	+++	+	-	+	++	++	-	+	+++	15mm
P8	+++	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
P11	++	+	+++	+	-	-	+	+	+	+	-	-
P25	+++	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+++	20mm
P29	+++	+	-	-	++++	+	+	+++	+	+	+++	20mm
P30	+	-	++	-	+	+	+++	+++	+	+	++	11mm
P31	+++	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	5mm
P33	+++	+	+++	-	-	+	+++	++	+	+	++	11mm
P36	-	-	+	+	++	+	+	-	-	+	-	-
P37	+	-	-	-	++++	-	+	-	-	+	-	-
P39	-	+	+	++	+	-	+	++	+	+	+++	15mm
P41	+	-	+++	-	++++	+	++	-	-	+	-	-
p43	+++	-	++	-	+++	+	++	+	-	+	+++	15mm
P44	-	-	-	+	+	-	++	-	-	-	-	-
P45	+++	+	+++	+	+	+	++	+	+	+	+++	15mm
P48	+++	+	+++	++	++++	+	-	++	+	+	-	-
P50	-	-	-	++	-	-	+	+	-	+	+++	20mm
P53	+	+	+++	-	+	+	+	++	+	+	++	10mm
P56	+++	+	+++	+	++	-	++	++	+	+	+++	15mm
P57	+	-	++	+	++++	-	-	-	-	+	+++	15mm
P59	++	-	-	++	-	-	+	++	+	+	++	10mm
P61	+	-	++	+	++++	++	+	+	+	+	-	-
P62	-	-	+	-	++++	-	-	+	+	+	-	-
P64	+	-	++	+	++	-	+	-	-	+	-	-
P65	+	+	-	+	+++	++	++	++	+	+	++	14mm
P66	++	+	+++	-	+++	+	++	+	+	+	-	-
P68	++	+	++	+	++	-	+++	+	-	+	-	-
P69	+	+	+++	-	++++	+	+	+	+	+	++++	25mm
P70	+++	+	+	-	+++	+	+	+	+	+	++	10mm
P71	-	-	+	-	++++	-	++	-	-	-	+	5mm

Prot .: protéase ; Gélat.: gélatinase; Amyl.: amylase ; Cellul.: cellulase; AIA: acide indol acétique; Lipase ; HCN: acide cyanhydrique; NH₃: Ammoniaque; Phosp.: Phosphatase ; Sidéro. : Sidérophore, Chitine, Chitinase.

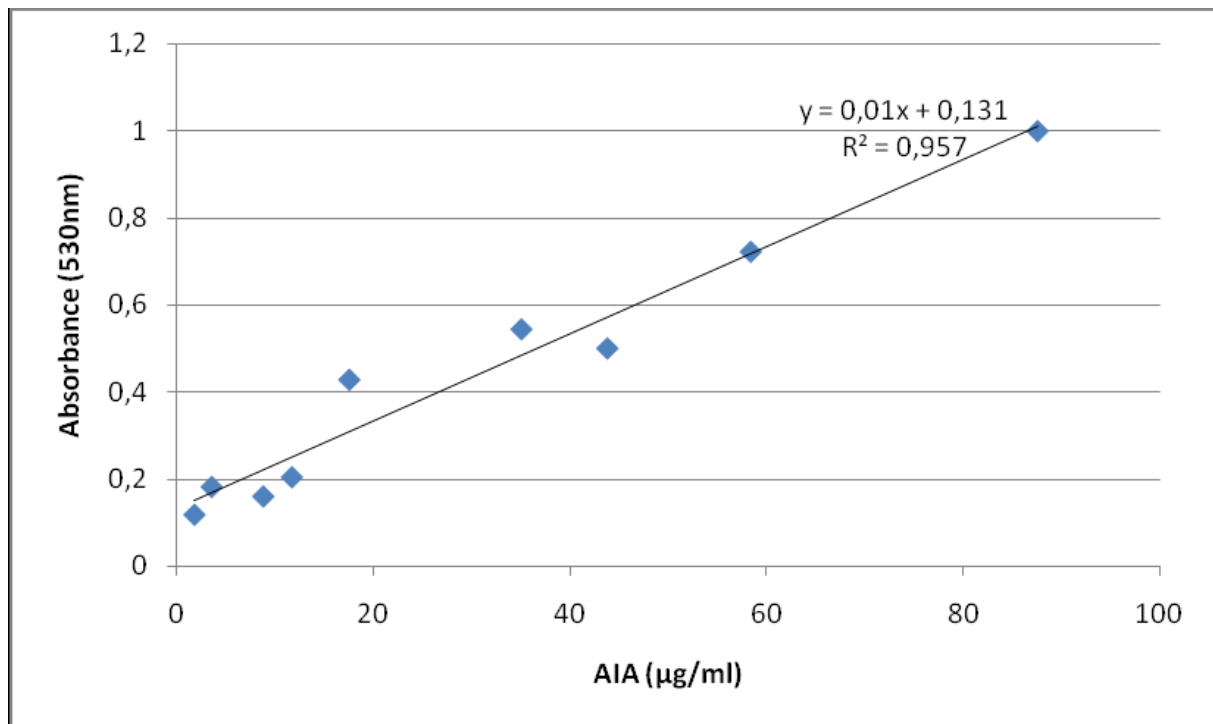


Figure : Courbe d'étalonnage de l'acide indole acétique (AIA).

Annexe 2

Principaux milieux de culture (composants g/litre).

King B: (King et al., 1954) pH 7,2

- Agar purifié 12,0
- Peptone bactériologique 20,0
- Glycérol 10,0
- K₂HPO₄ (anhydre) 1,5
- MgSO₄, 7H₂O 1,5

PDA (Potato Dextrose Agar): pH 7

- Saccharose 20,0g
- Agar 15,0g
- Pommes de terre 200g
- Eau distillée 1000ml

Milieu LB : pH 7

- Tryprone 10g
- Extrait de levure 5g
- NaCl 5g
- Agar 15g

Milieu de Pikovskaia (solubilisation des phosphates) pH7

- Sucrose 10g
- Ca₃ (PO₄)₂ 5g
- MgCl₂.6 H₂O 5g
- MgSO₄. 7 H₂O 0,25g
- KCl 0,2g
- (NH₄)₂SO₄ 0,1g
- BPB 0,25g

Milieu pour production d'HCN

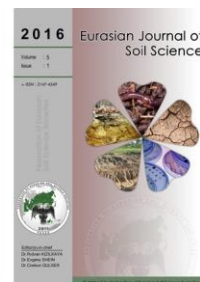
- TSA ou TSB à 4,4 g de glycine

Milieu pour production d'AIA

- LB à 5 mM de tryptophane
- 0,06% de SDS

Milieu SNA

- K₂HPO₄ : 1.0g
- KNO₃ : 1.0g
- MgSO₄.7H₂O : 0.5g
- KCl : 0.5g
- Glucose : 0,20g
- Saccharose : 0,20g
- Agar : 20g
- H₂O distillée ou osmosée : 1000ml



Screening for *Pseudomonas* and *Bacillus* antagonistic rhizobacteria strains for the biocontrol of *Fusarium* wilt of chickpea

Hannane Abed ^a, Nouredine Rouag ^{b,*}, Dahou Mouatasssem ^c, Amar Rouabhi ^b

^a Department of Microbiology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Ferhat Abbas Sétif 1, Sétif, Algeria

^b Department of Agronomy, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Ferhat Abbas Sétif 1, Sétif, Algeria

^c Department of Agronomy, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Mohamed El Bachir El Ibrahimi (UMBI), de Bordj Bou Arreridj, Algeria

Abstract

The aim of this work is to study the ability of several isolates belonging to Rhizobacteria (*Pseudomonas* and *Bacillus*) collected from several chickpea growing areas in Algeria, to control the mycelium growth of *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*. Interesting isolates were characterized for their morphological characteristics, physiological and biochemical activities as potential bio-control agent. Fungal inhibition tests were performed using plate assay and each isolate were tested for the production of protease, cyanide hydrogen, indole acetic acid, antifungal volatile and extracellular compound. According to API 50 CH, we are able to identify six *Bacillus* species (*B. subtilis*, *B. circulans*, *B. lentus*, *B. aneurinilyticus*, *B. firmus*, *B. licheniformis*; and with API 20NE test we have identified three *Pseudomonas* species (*P. aeruginosa*, *P. luteola*, *P. fluorescens*). The ability of bacterial isolates was varied in production of Protease, Gelatinase, Amylase, Cellulase, Acid Indole acetic, Lipase, Catalase and Cyanid Hydrogen. This is traduced in different rate of inhibition growth due to various extracellular compounds, where B61 (*Bacillus aneurinilyticus*) and P39 (*Pseudomonas luteola*) and P70 (*Pseudomonas fluorescens*) were the most efficient with 77 and 55.5% respectively, while B39 (*Bacillus firmus*) and P41 (*Pseudomonas luteola*) were the most efficient by volatile compounds with 70.5 and 77.5% respectively. Our results indicate that these bacteria isolates can be used in the biocontrol of *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*.

Keywords: Antagonistic, *Bacillus*, Bio-control, Chickpea, *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas*

Article Info

Received : 08.12.2015

Accepted : 20.01.2016

© 2016 Federation of Eurasian Soil Science Societies. All rights reserved

Introduction

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is an important pulse crop grown and consumed all over the world, especially in the Afro-Asian countries (Jukanti et al., 2012). Fungal plant pathogens are among the most important factors that cause serious losses to agricultural products annually (Ekundayo et al., 2011). Chickpea production is severely limited by *Fusarium* wilt which is caused by *F. oxysporum* Schlechtend. Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo and K. Sato. (Jalali and Chand, 1992). *Fusarium* wilt is a serious disease threat, especially in low rainfall areas, where weather conditions are favourable for disease development. From 33 countries of

* Corresponding author.

Department of Agronomy, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Ferhat Abbas Sétif 1 (UFAS-1), Sétif, Algeria

Tel.: +213772176 508

e-ISSN: 2147-4249

E-mail address: rouag_rn@yahoo.fr

DOI: <http://dx.doi.org/10.18393/ejss.2016.3.182-191>

the world has been reported (Nene et al., 1996) causing 10–15% yield losses annually (Singh and Dahiya, 1973) depending upon the environmental conditions. The disease is more prevalent in the Indian subcontinent, United States, Tunisia, Algeria, Turkey, Ethiopia, Spain, and Mexico (Halila and Strange, 1996; Labdi, 1990; Nene et al., 1989; Westerlund et al., 1974). In severe cases, yield losses reaches 100% under favourable conditions in chickpea (Landa et al., 2004). Other species and formae specialis of *Fusarium* also cause wilt in chickpea and produce mycotoxins (Gopalakrishnan et al., 2005), which markedly reduce the potential of crop rotation as a disease management strategy. *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (FOC) may survive in soil and on crop residues as chlamydospores for up to six years in the absence of susceptible host, and spread by means of both soil and infected seed (Haware et al., 1978).

It is difficult to manage the disease either through crop rotation or application of chemicals because of soil nature persistence and its capacity to survive for long time even in the absence of host (Haware et al., 1996). Efficacy of wilt management was improved when bio-control agents were combined with cultural practices such as sowing date (Landa et al., 2004). Biological control provides an alternative to the use of synthetic pesticides with the advantages of greater public acceptance and reduced environmental impact (Reino et al., 2008). However, management of fungal diseases using antagonistic microorganisms, known as biological control, has been the focus of intense research worldwide (Killani et al., 2011). The use of bacteria as biocontrol agents of soil borne plant pathogens, as an alternative or complementary strategy to physical and chemical disease management, has been investigated for over 70 years (Weller, 1988). The lack of consistency in performance of beneficial bacteria such as *Pseudomonas* spp. or *Bacillus* spp. under field conditions has limited their use in commercial agriculture (Raaijmakers et al., 2002). Much of that inconsistency has been attributed to variability in physical and chemical properties within niches occupied by biocontrol agents that affect both colonization and expression of biocontrol mechanisms such as antibiosis, parasitism, competition and induced resistance.

Various mechanisms are involved in the biological control of fungal pathogens by Plant Growth Promoting *Rhizobacteria* (PGPR). These mechanisms include the production of secondary metabolites such as antibiotics, siderophores, hydrolytic enzymes, volatile extracellular metabolites, hydrogen cyanide and competition for nutrients, promotion of plant growth and, finally, induced resistance within the plants (Moeinzadeh et al., 2010; Kloepper et al., 1992)

Therefore, biological control offers potential for suppression of *Fusarium* wilt under field conditions, particularly when used in combination with cultivars with partial resistance to the disease and choice of sowing date. Species of *Bacillus* have also been known to produce compounds which promote plant growth directly or indirectly, hydrogen cyanide (HCN), siderophores, indole acetic acid (IAA), solubilize phosphorous and antifungal activity (Saharan and Nehra, 2011; Wahyudi et al., 2011; Godinho et al., 2010). The objectives of this research were: (1) to characterize and select *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates from rhizospheric and rhizoplastic soils infested with chickpea wilt, and (2) to determine their antagonistic activity *in vitro* in dual cultures against *Fusarium oxysporum ciceris*.

Material and Methods

Preliminary screening

One hundred and forty for bacterial isolates were tested for their ability to produce antifungal substances against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* using a dual-culture *in vitro* assay on PDA plates. Twenty μ l of each bacterial suspension (10^8 cfu/ml) was placed on the plate. After 48h incubation at 28°C, a single 6 mm diameter mycelial disc was placed at the extremity of plates. Then, plates were incubated at 27-29 °C in darkness and after 5 days the growth diameter of the pathogen (distance between the point of placement of fungal disk and actively growing edges of the fungus) was measured. The percentage of growth inhibition was calculated using the method described by Erdogan and Benlioglu (2010). This experiment was conducted twice. Bacteria with inhibitory potential were selected for further experiments.

Identification of bacterial antagonist

Initially, the selected isolates were identified based on gram positive, spore forming, and fluorescent pigment production, aerobic or anaerobic growth. To identify *Pseudomonas* species, oxidase, catalase, amylase, protease, cellulase, indole acetic acid, lipase and gelatinase, growth at 41°C, growth at 4°C tests were further performed. To identify *Bacillus*, motility, growth at 45°C, anaerobic growth in glucose broth,

were assessed (Shaad, 1988). The Analytical Profile Index (API), particularly API 20E and API 50CHB were used as supplementary tests, for the identification and differentiation of *Pseudomonas*, *Bacillus* and related species, respectively (Logan and Berkeley, 1984).

Protease production

Bacterial isolates were tested for protease production by growing them on skim milk agar (SKM) (Chantawannakul et al., 2002). The ability to clear the skim milk suspension in the agar was taken as evidence for the secretion of protease. Non- bacteria inoculated plates were used as control.

Hydrogen cyanide production

Production of hydrogen cyanide was determined on nutrient agar medium+ 4.4g of glycine. 100 µl of bacterial culture (48 h) were streaked on the surface of medium, and then sterilized filter papers were soaked in 2.0% Na₂CO₃ in 5.0% (w/v) picric acid and placed in the upper lid of the Petri dish. The Petri dishes were sealed with parafilm and incubated at 30 °C for 4 days. A change in the colour of the filter paper from yellow to reddish brown was accepted as an index for cyanogenic activity. Non - inoculated plates with bacteria was used as control (Alstrom, 1987).

Indole acetic acid production (IAA)

The production of IAA was determined as described by Bric et al. (1991). Bacterial strains were inoculated into nutrient broth (peptone, 5 g; yeast extract, 1.5 g; beef extract, 1.5 g; and NaCl, 5 g; each per liter) and incubated at 30 °C for 5 days. A 5 ml culture was removed from each tube and centrifuged at 10,000 rpm for 15 min. An aliquot of 2 ml supernatant was transferred to a fresh tube to which 100 µl of 10 mM orthophosphoric acid and 4 ml of reagent (1 ml of 0.5 M FeCl₃ in 50 ml of 35% HClO₄) were added. The mixture was incubated at room temperature for 25 min, and the absorbance of pink colour developed was read at 530 nm using a spectrophotometer.

Production of volatile antibiotics

Firstly, 100 µl of bacterial suspension (1×10⁷ cfu/ml) from each isolate were sprayed on the surface of a Petri plate containing nutrient agar medium and incubated at 27-30 °C for two days. In another Petri plate containing PDA medium, a 5 mm disk of a 7 days-old pure culture of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* was placed at the centre. Then both half plates were placed face to face preventing any physical contact between the pathogen and the bacterial suspension. Plates were sealed with parafilm. In the control plates, bacterial suspension was replaced with sterile water. Plates were incubated at 27-29 °C for 5 days and the percentage of inhibition zone was calculated for each isolates (Fiddaman and Rossall, 1993). For each treatment, there were four replicates and the experiment was repeated twice.

Data analysis

The results obtained were statistically processed through the analysis of variance ANOVA and B Tukey test at *P<0.05 and **P<0.01 to evaluate the significance between treatments. Correlation matrices have also been developed to define the interactions between the various parameters studied using SPSS version 18.0 and Microsoft Excel software 2010.

Results

Bacterial isolates Screening and characterization

Sixteen isolates for each genus (*Pseudomonas* and *Bacillus*) out of one hundred and forty for bacteria strains isolated from chickpea rhizosphere have shown substantial inhibition zones against and revealed a high antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in *in vitro* tests (Figure 1). Based on biochemical, physiological and morphological properties, selected isolates were identified as *Bacillus subtilis* (B40, B45, B48, B62 and B65), *Bacillus circulans* (B72 and B73), *Bacillus lentus* (B79, B69, B53 and B41), *Bacillus aneurinilyticus* (B64, B61 and B47), *Bacillus firmus* (B39) and *Bacillus licheniformis* (B59) (Table 1). Three species of *Pseudomonas* were identified: *Pseudomonas aeruginosa* (P29, P37, P44 and P50), *Pseudomonas luteola* (P31, P36, P39, P41, P53, P59, P61, P64 and P65) and *Pseudomonas fluorescens* (P66, P70 and P45) (Table 2).

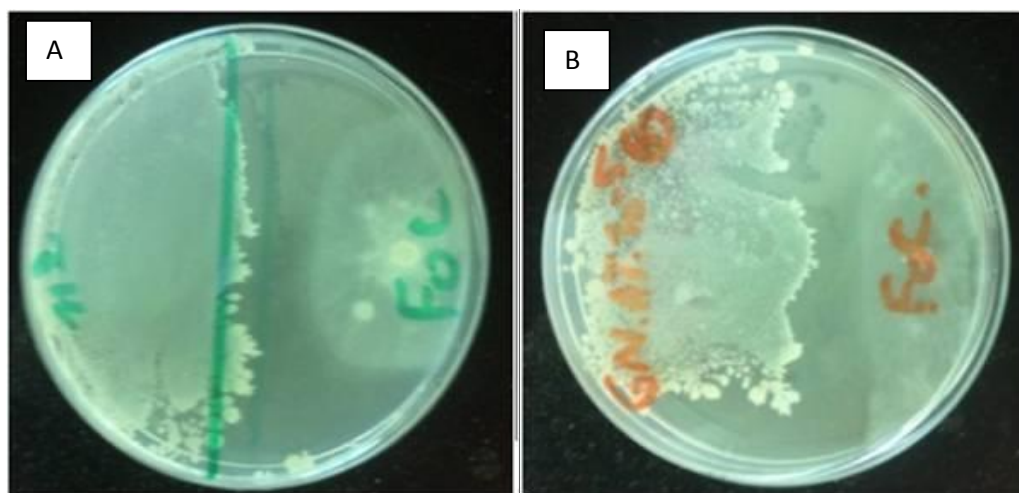


Figure 1. Inhibition of mycelium growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* by bacterial isolates on PDA media by dual-culture assay (A *Pseudomonas*; B *Bacillus*).

Table 1. Antimicrobial metabolites activities of *Bacillus* isolate against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

Isolates	DC (%)	IZ (mm)	VC (%)	HCN	Prot	Gel	Amy	Cel	IAA	Lip	Cat
B39	70,5	9	70.5	++	+++	-	+	-	+	+	+
B40	69,5	5	60.5	++	+++	+	+++	+	+	-	+
B41	59,5	7	30	++	+++	-	+	++	+	+	+
B45	64	12	60.5	++	+++	+	+++	+	+	-	+
B47	55	10	35	+	+++	+	+++	++	-	-	+
B48	48	7	57	++	+++	+	++	++	+	-	+
B53	40	10	50	++	++	-	++	-	++	+	+
B59	54,5	5	14.5	++	+	-	+++	+	+	+++	+
B61	77 ^c	3	9	-	++	+	+++	++	+	-	+
B62	45	1	20	+	+++	+	+++	+	+++	++	+
B64	68,5	7	46.5	+	+	-	+++	-	+++	+	+
B65	61	10	55	+	++	-	+++	-	+	+	+
B69	52,5	5	15.5	++	+++	+	+++	+	+	++	+
B72	60	5	50	+	+	+	++	++	+	++	+
B73	64,5	7	40.5	+	+	+	+++	+	+	+	+
B79	64,5	4	34	-	+++	+	++	++	++	-	+
Average	59,63	6,69	37,78								
Gaptype	9,99	2,96	16,55								

DC = Percent growth inhibition in dual culture method, IZ : diameter of Inhibition Zone in dual culture, VC= Percent growth inhibition in volatile compound, HCN : Cyanid Hydrogen, Prot : Protease, Gel : Gelatinase, Amy : Amylase, Cel : Cellulase, IAA : Indole acetic Acid, Lip : Lipase, Cat : Catalase.

In vitro antifungal activity

Extracellular and volatiles compounds

In dual culture test, *Bacillus* strains showed to have more inhibition of the pathogen growth in the PDA medium than *Pseudomonas* isolates. Indeed, with extracellular compounds diffused in the PDA medium, *Bacillus* strains (Table 1) gave an average of inhibition equal to $59.63 \pm 9.99\%$ vastly superior to $47.16 \pm 9.32\%$ recorded with *Pseudomonas* strains (Table 2). While, with volatiles compounds, *Pseudomonas* appears to be more effective in inhibition of the pathogen mycelium development. Thus, we obtained $42.15 \pm 22.77\%$ of mycelial growth inhibition by *Pseudomonas* isolates (Table 2) compared to $37.78 \pm 16.55\%$ recorded by *Bacillus* isolates (Table 1). If we look to gap-type calculated ($22,77\%$ and $16,55\%$), we must note

here the wide intraspecific variability in both genera studied, particularly with volatile compounds it is more pronounced.

Table 2. Antimicrobial metabolites activities of *Pseudomonas* isolate against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

Isolates	DC (%)	IZ (mm)	VC (%)	HCN	Prot	Gel	Amy	Cel	IAA	Lip	Cat
P29	52	2	45	+	+++	+	-	-	++++	+	+
P31	55	18	21	+	+++	-	-	-	+	-	+
P36	41	10	37	+	-	-	+	+	++	+	+
P37	49	7	39.5	+	+	-	-	-	++++	-	+
P39	55,5	18	68	+	-	+	+	++	+	-	+
P41	45	7	77.5	++	-	-	+++	-	++++	+	+
P44	40,5	7	66	++	-	-	-	+	+	-	+
P45	46,5	0	66	++	+++	+	+++	+	+	+	+
P50	49	7	17	+	-	-	-	++	-	-	+
P53	71	8	52	+	+	+	+++	-	+	+	+
P59	34,5	1	4	+	++	-	-	++	-	-	+
P61	40,5	4	13	+	+	-	++	+	++++	++	+
P64	45,5	8	72	+	+	-	++	+	++	-	+
P65	38	15	9.5	++	+	+	-	+	+++	++	+
P66	36	10	42	++	++	+	+++	-	+++	+	+
P70	55,5	6	45	+	++	+	+++	-	+++	+	+
Average	47,16	8,00	42,15								
Ecartye	9,32	5,35	22,77								

DC = Percent growth inhibition in dual culture method, IZ : diameter of Inhibition Zone in dual culture, VC= Percent growth inhibition in volatile compound, HCN : Cyanid Hydrogen, Prot : Protease, Gel : Gelatinase, Amy : Amylase, Cel : Cellulase, IAA : Indole acetic Acid, Lip : Lipase, Cat : Catalase.

As regards the connection between the percentage inhibition of mycelial growth and the inhibition zone, the results obtained do not show a direct bond because the largest zone of inhibition was not observed with the strains giving the higher level of inhibition either with *Bacillus* or *Pseudomonas* strains. Indeed, it was the strain B45, P31 and P39 that have gave the high read inhibition zones with 12 and 18mm respectively (Table 1 and 2). We can conclude, the general inhibition is due to the combined effects of several extracellular and volatile compounds.

Interspecific inhibition efficiency

In the case of *Bacillus* genera, the most efficient strains in the inhibition of mycelial growth were B61 with 77% of efficiency in extracellular compounds and B39 with 70.5% of efficiency in volatiles compounds (Figure 2). In the case of *Pseudomonas*, P53 was the most efficient in extracellular compounds (71%) and P41 (77.5%) in volatiles compounds tests (Figure 3). Regarding the interspecific efficiency, strain identified as *Bacillus firmus* appears as the more efficient (70,5%) in the inhibition of mycelia growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, both in extracellular and volatiles compounds tests. But the failure to identify a single strain, these results should be confirmed by interspecific comparison tests. With regard to *Pseudomonas*, there is very little difference between the three species identified by studying the effect of extracellular compounds, while in the case of volatile compounds, *Pseudomonas fluorescens* isolates seem to be more efficient with an average of 51 % of efficiency.

Both *Bacillus* and *Pseudomonas* isolates has gave a significant effect at 1% level according Tukey's test in inhibiting mycelia growth by extracellular compounds. These results were traduced by the appearance of three homogeneous groups and the distinction of B53, P31, P39, P53 and P70 isolates.

Production of antifungal metabolites

In vitro test using 32 bacterial strains against *Fusarium oxysporum* fs *ciceris* showed that different strains exhibited different combinations of antimicrobial metabolites. If all *Bacillus* strains have produced protease (Figure 4), amylase, catalase and Indole acetic acid excepting B47 isolate, however, they showed a great

variability in the production of gelatinase, cellulase and lipase as an enzyme products and HCN as a volatile compound (Table 1). With regard to *Pseudomonas* strains, except catalase and HCN which all strains gave a positive reaction, we note a high qualitative and quantitative variability between species and strains of *Pseudomonas*, in protease production (Figure 4), gelatinase amylase, lipase and IAA products (Table 2).

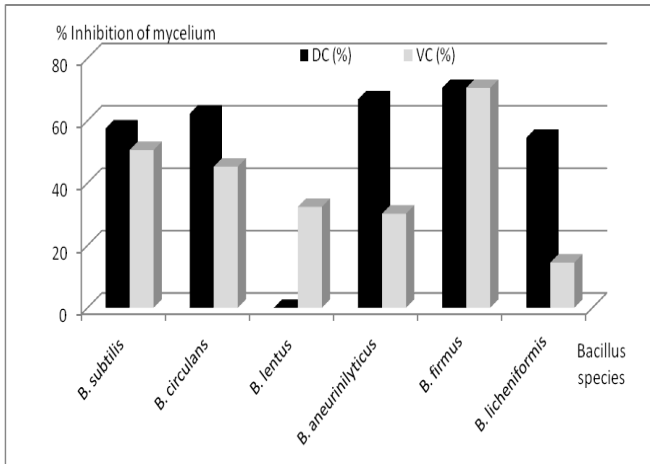


Figure 2. Inhibition of mycelium growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, by extracellular and volatiles compounds of *Bacillus* species.

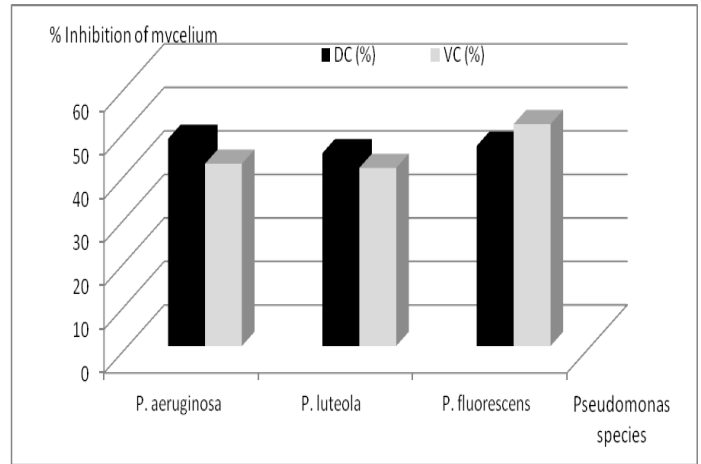


Figure 3. Inhibition of mycelium growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, by extracellular and volatiles compounds of *Pseudomonas* species.

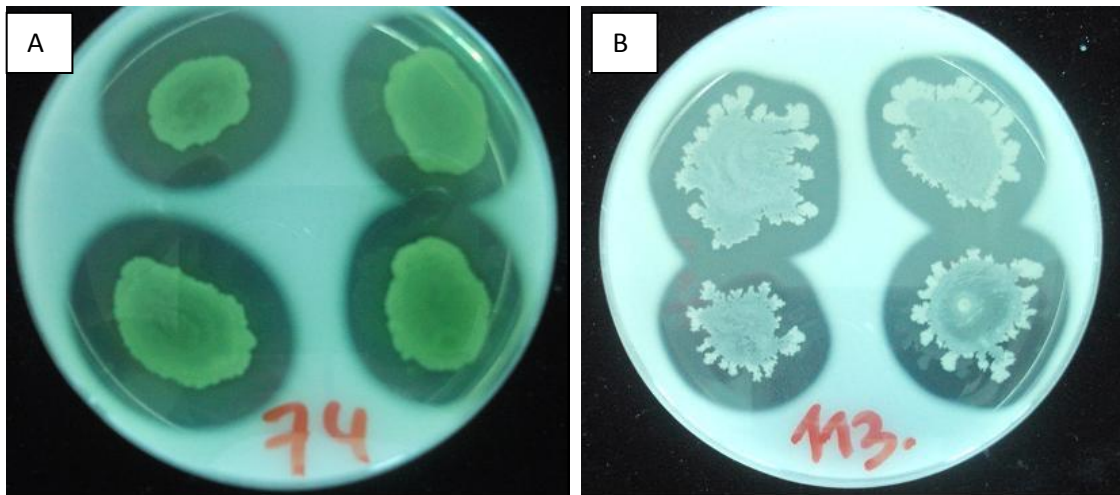


Figure 4. Enzyme activities: Protease production by bacterial isolates on PDA media (A *Pseudomonas* isolate; B: *Bacillus* isolate).

In the case of *Bacillus* strains, ANOVA analysis gave is a positive correlation between mycelia growth inhibition and inhibition zone, as well as for enzymatic activity between amylase and gelatinase. While, in the case of *Pseudomonas* strains, it has registered several positive correlations among different biochemical activities, example: the amylase is positively correlated with gelatinase and lipase, whereas the production of IAA is correlated with the cellulase and lipase production. From the principal components analysis (PCA), it emerges an entirely consistent correlation between biochemical tests and identification of bacterial species by API 50 CH and API 20NE.

Bacterial antagonism towards *Fusarium* species and strains

The results obtained show a great variability in inhibiting mycelial growth of the three FOC strains tested. Indeed, the results of direct confrontation in dual cultivation give the isolate FOC1 of the pathogen as the most sensitive fungal strain to antagonism of *Bacillus* isolates with an average reduction of mycelial growth equal to 58.16%. In addition, the rest of the *Bacillus* isolates do not exhibit a great difference in the effectiveness of the antagonism because the standard deviation is equal to 10.26 between the four deviations calculated. In contrast, the FOC2 behaves very differently when it is confronted with the *Bacillus* isolates,

giving an average of reducing in mycelial growth equal to 40.87%. We have obtained zero inhibition with three strains of *Bacillus* ie B48, B65 and B69. This has resulted in a standard deviation of about 23.26. The FOC3 and *Fusarium solani* isolate gave intermediate sensitivity resulted in average reduction of mycelial growth of about 43.81% and 49.47%, respectively (Figure 5, 6).

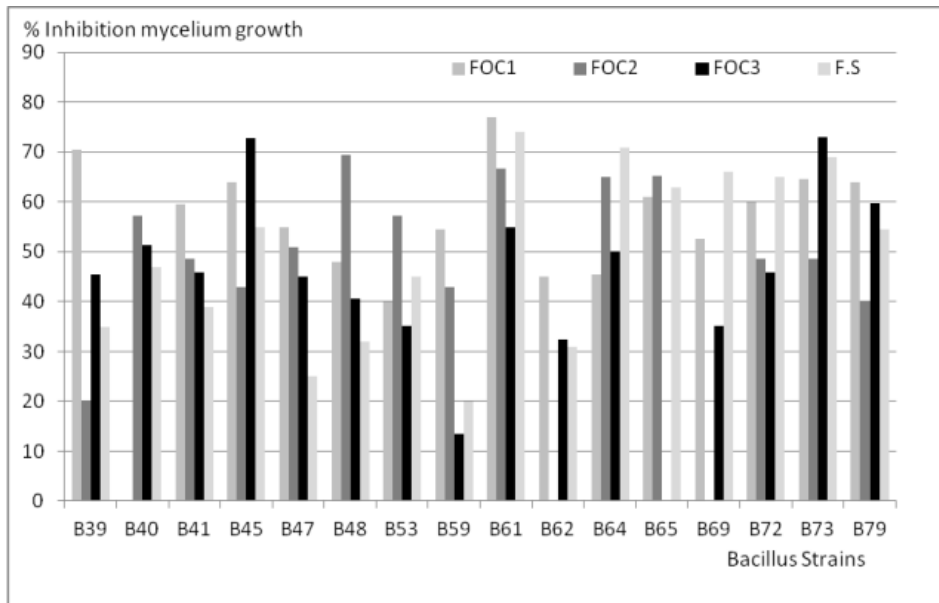


Figure 5. *Bacillus* strains antagonistic effect on the hyphal growth in dual culture of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* strains (FOC1, FOC2 and FOC3) and *Fusarium solani*.

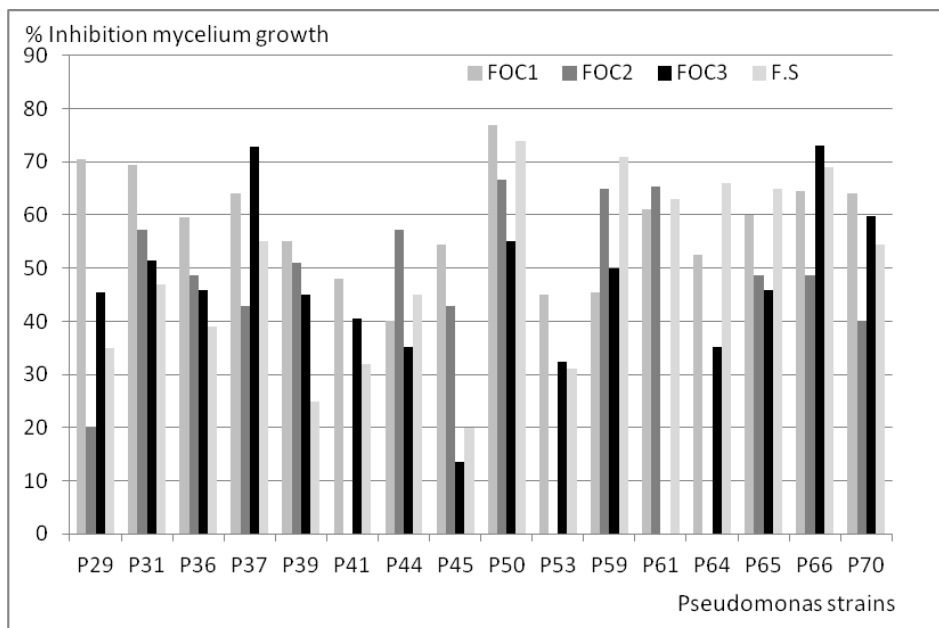


Figure 6. *Pseudomonas* strains antagonistic effect on the hyphal growth in dual culture of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* strains (FOC1, FOC2 and FOC3) and *Fusarium solani*.

Tukey's test provides a significant effect at 1% and 5% level in the inhibition of mycelia growth with *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates, respectively; thus resulting in the emergence of three distinct groups for each bacterial genus. While the effect of volatiles compounds was not significant at 5% level, that's mean, there is little quit diversity between strains tested.

Discussion

Fusarium oxysporum f. sp. *ciceris* is economically significant disease agent on chickpea. Due to the soil-borne nature of the disease, chemical applications for controlling the disease are rarely successful. Inconsistencies in biocontrol under varying environmental conditions have been a common limitation of soil borne

pathogens. The present research was conducted to evaluate the efficacy of *Pseudomonas* and *Bacillus* species and strains against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. The bacterial strains are in most cases correlated and more efficient in the inhibition of the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* isolates, if they have the same agro-ecological origin; this makes them very effective in the biocontrol. Our results corroborate with those of [Weller \(1988\)](#) which states that the use of rhizobacteria in the control of plant diseases is most effective when rhizobacteria were isolated from the same rhizosphere of host plant. In this study, all bacterial isolates were selected from rhizosphere of chickpeas fields. Some bacterial isolates showed high inhibition activity on pathogen, whereas others showed only mild or no activity at all. About 39% (57 of 144) of isolates showed antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in *in vitro* tests and giving more than 30% of inhibition of mycelia growth. The rest of isolates tested exhibited no or weak antagonistic activity against the pathogen on PDA plates assay. Similar results have previously been reported ([Erdogan and Benlioglu, 2010](#); [Tjamos et al., 2004](#); [Khot et al., 1996](#)).

Reduction of fungal growth by certain PGPR and formation of inhibition zones were presumably due to the antifungal substances and/or cell wall degrading enzymes; released by the bacteria into the culture medium ([Fatima et al., 2009](#)). Also, [Sarhan et al. \(2001\)](#) and [Montealegre et al. \(2005\)](#) pointed that the cell free culture filtrate of *B. subtilis* inhibited the mycelial growth, radial growth, and spore germination and germ-tubes length of *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*. Many strains of *Bacillus* strains have been found to be potential biocontrol agents against fungal pathogens. This antifungal action involves the production of antibiotics, especially within soil microsites ([Fravel, 2005](#)).

Cyanide is a toxic and dreaded chemical produced by many rhizobacteria. Some bacteria synthesis it, others excrete it and yet others metabolize it in order to avoid predation and competition ([Zeller et al., 2007](#)). All *Bacillus* species and strains efficiency of inhibition of mycelium growth is due to the extracellular products than volatile compounds. It has been reported that *Bacillus* strains have been able to inhibit the growth of a variety of fungal pathogens because of their ability to produce a vast array of antibiotics such as Zwittermicin, Bacillomycin, Fengycin, Bacilysin and Difficidin ([Athukorala et al., 2009](#); [Chen et al., 2009](#)). While with *Pseudomonas* species and strains, *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas luteola* join *Bacillus* in their action mode, whereas *Pseudomonas fluorescens* inhibits the development of the mycelium much more with volatile compounds. These results are in agreement with the research previously carried out by [Romanenko and Alimov \(2000\)](#). Production of Hydrogen cyanide in *Bacillus* is about 50% in both rhizospheric soils and nodules compared to *Pseudomonas* that is over 80% ([Ahmad et al., 2005](#)). This result demonstrated that cyanide hydrogen was one of the most important volatile compounds of *Pseudomonas* spp. Plant growth was enhanced *in vitro* by most of the rhizospheric isolated that produced HCN ([Wani et al., 2007](#)).

The majority of selected *Pseudomonas* and *Bacillus* strains showed amylase and protease activity pronounced comparatively to other metabolites productions. The protease is known that has interference in wall degrading of fungal pathogen ([Ahmadzadeh and Sharifi-Tehrani, 2009](#)). The *Pseudomonas* isolates had shown a high level of production of indole acetic acid comparatively to *Bacillus* isolates. [Xie et al. \(1996\)](#) indicated that compared to other strains, *Pseudomonas* strains had higher levels of IAA production. According to [Joseph et al. \(2007\)](#), while working with chickpea, all *Bacillus* isolates produced IAA. Even though some microorganisms produce high concentration of auxin, that is, IAA and this helps to increase plant growth and yield in wheat crop, others producing low concentration of IAA also improve plant growth ([Tsavkelova et al., 2007](#)).

Regarding bacterial antagonism towards *Fusarium* species and strains, our results agree with [Adebayo and Ekpo \(2005\)](#), because *B. subtilis* inhibited fungal growth and also promoted the growth of tomato plant in screen house trial. *B. subtilis* has been shown to have a broad spectrum of antimicrobial activities over diverse fungal and bacteria pathogen ([Grover et al., 2009](#)). This may be as a result of production of antibiotic, competition with pathogen for nutrients and direct antagonism ([Akhtar et al., 2010](#)). *Bacillus* spp. are known to reduce wilting index in *F. udum*, increase plant growth and cause rapid colonization of tomato tissue in order to induce systemic resistance against *F. oxysporum* ([Kloepper et al., 2004](#)).

As regards the behavior of FOC isolates and *Fusarium solani* in direct confrontation with *Pseudomonas* isolates in dual culture, it appears that the *F. solani* was the most sensitive with 53.06% of mycelia growth reduction followed by FOC1 isolate. The FOC2 is confirmed as the isolate which has the most variable behavior when confronted with different *Pseudomonas* isolates. Indeed, we noted that three isolates (P37, P53 and P65) did not any impact on mycelia growth. Besides that, we found that *Bacillus* and *Pseudomonas*

strains are more effective in inhibiting mycelia growth if they came from the same geographical area with *Fusarium* strains. In general, *F.oxysporum* f.sp *ciceris* was more sensitive to bacterial metabolites and antagonisms than *F. solani* evidenced by the inhibition percentages recorded (Mudawi and Idris, 2014).

In conclusion, this study shows that some species and strains of *Bacillus* and *Pseudomonas* are very beneficial and effective as agents of biocontrol *in vitro* tests. The most interesting bacterial strains are being evaluated *in vivo* tests in the presence of the host plant for the study of their antagonistic faculty. Research must continue to be able to produce industrially as microbial biocontrol agents enjoying the characteristic of being respectful of human health of the environment in general.

References

- Adebayo, O.S., Ekpo, E.J.A., 2004. Efficiency of fungal and bacterial biocontrol organisms for the control of fusarium wilt of tomato. *Nigerian Journal of Horticultural Sciences* 9: 63-68.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S., 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of Azotobacter and Fluorescent Pseudomonas in the presence and absence of tryptophan. *Turkish Journal of Biology* 29(1): 29-34.
- Ahmadzadeh, M., Tehrani, A.S., 2009. Evaluation of fluorescent pseudomonads for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. *Biological Control* 48(2): 101-107.
- Akhtar, M.S., Shakeel, U., Siddiqui, Z.A., 2010. Biocontrol of Fusarium wilt by *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Rhizobium* sp. on lentil. *Turkish Journal of Biology* 34(1): 1-7.
- Alström, S., 1987. Factors associated with detrimental effects of rhizobacteria on plant growth. *Plant and Soil* 102(1): 3-9.
- Athukorala, S.N., Fernando, W.G., Rashid, K.Y., 2009. Identification of antifungal antibiotics of Bacillus species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. *Canadian Journal of Microbiology* 55(9): 1021-1032.
- Bric, J.M., Bosrock, R.M., Silversone, S.E., 1991. Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilization on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 57(2): 535-538.
- Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E., Lumyong, S., 2002. Characterization of protease of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *ScienceAsia* 28(3): 241-245.
- 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. *Journal of Biotechnology* 140(1-2): 38-44.
- Ekundayo, E.A., Adetuyi, F.C., Ekundayo, F.O., 2011. In vitro antifungal activities of Bacteria associated with maize husks and cobs. *Research Journal of Microbiology* 6(4): 418-424.
- Erdogan, O., Benlioglu, K., 2010. Biological control of *Verticillium* wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions. *Biological Control* 53(1): 39-45.
- Fatima, Z., Saleemi, M., Zia, M., Sultan, T., Aslam, M., Rehman, R., Chaudhary, M.F., 2009. Antifungal activity of plant growth-promoting rhizobacteria isolates against *Rhizoctonia solani* in wheat. *African Journal of Biotechnology* 8(2): 219-225.
- Fiddaman, P.J., Rossall, S., 1993. The production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Microbiology* 74: 119-126.
- Fravel, D.R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 43: 337-359.
- Godinho, A., Ramesh, R., Bhosle, S., 2010. Bacteria from sand dunes of Goa promoting growth in Eggplant. *World journal of Agricultural Science* 6(5): 555-564.
- Gopalakrishnan, S., Beale, M.H., Ward, J.L., Strange, R.N., 2005. Chickpea wilt: identification and toxicity of 8-O-methyl-fusarubin from *Fusarium acutatum*. *Phytochemistry* 66(13): 1536-1539.
- Grover, M., Nain, L., Saxena, A.K., 2009. Comparison between *Bacillus subtilis* RP24 and its antibiotic defective mutants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25(8): 1329-1335.
- Halila, M.H., Strange, R.N., 1996. Identification of the causal agent of wilt of chickpea in Tunisia as *Fusarium oxysporum* f. sp *ciceris* race 0. *Phytopathologia Mediterranea* 35(2): 67-74.
- Haware, M.P., Nene, Y.L., Natarajan, M., 1996. Survival of *Fusarium oxysporum* f.sp *ciceris* in the soil in the absence of chickpea. *Phytopathologia Mediterranea* 35(1): 9-12
- Haware, M.P., Nene, Y.L., Rajeswari, R., 1978. Eradication of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* transmitted in chickpea seed. *Phytopathology* 68: 1364-1367.
- Jalali, B.L., Chand, H., 1992. Chickpea wilt. In: Plant Diseases of International Importance. Vol. 1. Diseases of Cereals and Pulses. Singh, U.S., Mukhopadhyay, A.N., Kumar, J., Chaube, H.S. (Eds.), Prentice Hall, Englewood Cliffs, New York, USA. pp. 429-444.
- Joseph, B., Patra, R.R., Lawrence, R., 2007. Characterization of plant growth promoting Rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production* 1(2): 141-152.
- Jukanti, A.K., Gaur, P.M., Gowda, C.L.L., Chibbar, R.N., 2012. Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review. *British Journal of Nutrition* 108(S1): S11-S26.

- Khot, G.G., Taur, P., Daderwal, K.R., 1996. Rhizobacteria from chickpea (*Cicer arietinum* L.) rhizosphere effective in wilt control and promote nodulation. *Indian Journal of Microbiology* 36: 217-222.
- Killani, A.S., Abaidoo, R.C., Akintokun, A.K., Abiala, M.A., 2011. Antagonistic effect of indigenous *Bacillus subtilis* on root-/soil-borne fungal pathogens of cowpea. *Researcher* 3(3): 11-18.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.M., Zhang, S., 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94(11): 1259-1266.
- Kloepper, J.W., Tuzun, S., Kuć, J.A., 1992. Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Science and Technology* 2(4): 349-351.
- Labdi M. (1990). Chickpea in Algeria. Options Méditerranéennes, Série Séminaires 9: 137-140.
- Landa, B.B., Navas-Cortés, J.A., Jiménez-Díaz, R.M., 2004. Integrated management of fusarium wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. *Phytopathology* 94(9): 946-960.
- Logan, N.A., Berkeley, R.C., 1984. Identification of *Bacillus* Strains Using the API System. *Journal of General Microbiology* 130(7): 1871-1882.
- Moeinzadeh, A., Sharif-Zadeh, F., Ahmadzadeh, M., Heidari Tajabadi, F., 2010. Biopriming of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed with *Pseudomonas fluorescens* for improvement of seed invigoration and seedling growth. *Australian Journal of Crop Science* 4(7): 564-570.
- Montealegre J.R., Herrera, R., Velásquez, J.C., Silva, P., Besoain, X., Pérez, L.M., 2005. Biocontrol of root and crown rot in tomatoes under greenhouse conditions using *Trichoderma harzianum* and *Paenibacillus lentimorbus*. Additional effect of solarisation. *Electronic Journal of Biotechnology* 8(3): 249-257.
- Mudawi, H.I., Idris, M.O., 2014. The efficacy of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* isolates in the control of chickpea wilt pathogens. *Agriculture, Forestry and Fisheries* 3(5): 346-351.
- Nene, Y.L., Sheila, V.K., Sharma, S.B., 1996. A world list of chickpea and pigeonpea pathogens, 5th ed. ICRISAT, Patancheru, India, pp. 27.
- Nene, Y.L., Haware, M.P., Reddy, N.M.V., Philps, J.P., Castro, E.L., Kotasthane, S.R., Gupta, O., Singh, G., Shukia, P., Sah, R.P. 1989. Identification of broad-based and stable resistance to wilt and root-rots in chickpea. *Indian Phytopathology* 42: 499-505.
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M., de Souza, J.T., 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Leeuwenhoek* 81(1): 537-547.
- Reino, J.L., Guerro, R.F., Hernández-Galán, R., Collado, I.G., 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews* 7(1): 89-123.
- Romanenko, V.M., Alimov, M., 2000. Ability of representatives of *Pantoea agglomerans* as well as *Bacillus subtilis* and some species of *Pseudomonas* genus to inhibit growth of phytopathogenic bacteria and micromycetes and regulate the plant growth. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal* 62(4): 29-37 [in Ukrainian].
- Saharan, B.S., Nehra, V., 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. *Life Sciences and Medicine Research* 21: 1-30.
- Sarhan, M.M., Ezzat, S.M., Tohamy, A.A., El-Essawy, A.A., Mohamed, F.A., 2001. Biocontrol of *Fusarium* tomato wilt diseases by *Bacillus subtilis*. *Egyptian Journal of Microbiology* 36: 376-386.
- Shaad, N.W., 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd edition. St. Paul, Minn., APS Press, 164p.
- Singh, K.B., Dahiya, B.S., 1973. Breeding for wilt resistance in chickpea. In: Symposium on wilt problems and breeding for wilt resistance in Bengal gram. Indian Agriculture Research Institute, New Delhi, India, pp.1-14.
- Tjamos, E.C., Tsitsigiannis, D.I., Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Katinakis, P., 2004. Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarised soils as biocontrol agents against *Verticillium dahlia* of solanaceous hosts. *European Journal of Plant Pathology* 110(1): 35-44.
- Tsavkelova, E.A., Cherdynseva, T.A., Klimova, S.Y., Shestakov, A.I., Botina, S.G., Netrusov, A.I., 2007. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Archives of Microbiology* 188(6): 655-664.
- Wahyudi, A.T., Astuti, R.P., Widyawati, A., Meryandini, A.A., Nawangsih, A.A., 2011. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* 3(2): 34-40.
- Wani, P.A., Khan, M.S., Zaidi, A., 2007. Co-inoculation of nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria to promote growth, yield and nutrient uptake in chickpea. *Acta Agronomica Hungarica* 55(3): 315-323.
- Weller, D.M., 1988. Biological control of soilborn plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26: 379-407.
- Westerlund, F.V., Campbell, R.N., Kimble, K.A., 1974. Fungal root rot and wilt of chickpea in California. *Phytopathology* 64: 432-436.
- Xie, H., Pasternak, J.J., Glick, B.R., 1996. Isolation and characterization of mutants of plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2 that over produce indoleacetic acid. *Current Microbiology* 32(2): 67-71.
- Zeller, S.L., Brand, H., Schmid, B., 2007. Host-plant selectivity of rhizobacteria in a crop/weed model system. *PLoS ONE* 2(9): e846.